

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Etude des effets de l'hypoxie intermittente sur la régulation des facteurs de transcription Nrf2 et NF-kappaB dans les cellules MDA-MB-231

Braibant, Sabrina

Award date:
2010

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Etude des effets de l'hypoxie intermittente sur la régulation des facteurs de
transcription Nrf2 et NF- κ B dans les cellules MDA-MB-231**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Sabrina BRAIBANT

Août 2010

Etude des effets de l'hypoxie intermittente sur la régulation des facteurs de transcription Nrf2 et NF- κ B dans les cellules cancéreuses MDA-MB-231

BRAIBANT Sabrina

Résumé

L'hypoxie intermittente est une caractéristique du microenvironnement tumoral induisant des changements au niveau des cellules cancéreuses. L'hypoxie intermittente protège les cellules cancéreuses contre les traitements anticancéreux et favorise également la croissance tumorale, le processus angiogénique, la formation des métastases. Les cellules répondent aux fluctuations transitoires de la pression partielle en oxygène grâce aux mécanismes d'adaptation régulés par le facteur de transcription HIF-1. Les espèces oxygénées réactives (ROS) générées lors de l'hypoxie intermittente peuvent également activer deux autres facteurs de transcription, Nrf2 et NF- κ B. Au cours de ce mémoire, nous avons étudié l'influence de l'hypoxie intermittente sur la régulation de ces deux facteurs. Ces deux protéines pourraient être impliquées dans la réponse adaptative des cellules cancéreuses à l'hypoxie intermittente et jouer un rôle dans la protection et la défense des cellules contre les ROS. Nous avons pu mettre en évidence une influence de l'hypoxie intermittente sur la régulation de Nrf2 en condition basale. En effet, nous observons une sur-expression de ses gènes cibles. Par contre, l'hypoxie intermittente régule négativement Nrf2 en condition stimulée et l'on observe une diminution d'expression de ses gènes cibles. Quant au facteur NF- κ B, l'hypoxie intermittente a un effet positif sur son activité de liaison et l'expression de ses gènes cibles. En condition stimulée, l'hypoxie intermittente accentue l'effet du TNF- α . Il semblerait donc que l'hypoxie intermittente favorise une réponse pro-inflammatoire plutôt qu'une réponse antioxydante.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Août 2010

Promoteur: C. Michiels

Remerciements

En cette fin de mémoire, il est temps pour moi de remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Tout d'abord, je souhaite remercier Martine Raes pour m'avoir permis de réaliser mon mémoire au sein de l'Urbc.

Je tiens à remercier surtout ma promotrice, Carine Michiels, pour m'avoir permis d'intégrer l'équipe « HIF » mais aussi pour son encadrement, ses nombreux conseils ainsi que sa grande patience et ses corrections rapides tout au long du mémoire.

Je remercie également ma tutrice, Déborah Desmet, pour m'avoir encadré lors de ce mémoire et pour avoir répondu à mes nombreuses questions.

Merci également à l'équipe HIF ainsi qu'à tous les techniciens et les chercheurs de l'URBC qui m'ont aidé ou m'ont conseillé de près ou de loin lors du mémoire.

Un merci particulier aux mémorants avec lesquels j'ai pu passé de bons moments : Ludmilla, Stéphane, Diane et Marie. Le mémoire ne se serait pas passé de la même façon sans vous, lulu et Stéphane. Je n'ai pas vraiment eu à supporter tes excentricités, lulu, je dirais plutôt que tu as apporté beaucoup de vie dans ce bureau ! Un très grand merci, Stéphane, pour ton aide apportée ces derniers jours.

Enfin, je remercie mes parents pour m'avoir soutenue tout au long de ces études.

Liste des abréviations

Abl	Abelson murine leukemia viral
ATP	Adénosine TriPhosphate
AP-1	Activator Protein-1
ARE	Antioxidant Response Element
ARNm	Acide RiboNucléique Messenger
ARNT	Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
Bcl-3	B-Cell Lymphoma 3
Bcl-X _L	Basal-Cell Lymphoma-XL
bHLH	basic Helix Loop Helix
BTB	Broad complex, Tramtrack, Bric-a-brac
bZIP	basic Leucine ZIPper
CBP	CREB (cAMP Response Element Binding protein)-binding protein
Cco	Cytochrome c oxidase
cIAP	cellular Inhibitor of Apoptosis
COX-2	CycloOXygenase-2
CNC	Cap'N'Collar
c-Src	cellular-Sarcoma
CTR	Carboxyl Terminal Region
DGR	Double Glycin Repeat
DLG	Asp-Leu-Gly, human Nrf2 peptide 23LWRODIDLG31
ERK-1	Extracellular signal-Regulated Kinase 1
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ETGE	Gly-Thr-Gly-Glu, human Nrf2 peptide ⁷⁹ ETGE ⁸² .
FIH-1	Factor Inhibiting HIF-1α
GLUT	Glucose Transporter
GST	Glutathion-S-Transferase
HBS	HIF-Binding Site
HC	Hypoxie Chronique
HI	Hypoxie Intermittente
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor-1
HO-1	Hème-Oxygénase 1
HRE	Hypoxia Response Element
IKK	Inhibitor kappa B Kinase
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
IL	Interleukin
IVR	InterVening Region
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
Maf	MusculoAponeurotic Fibrosarcoma transcription factor
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MPTP	Mitochondrial Permeability Transition Pore
MSK	Mitogen- and Stress-activated protein Kinase
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium
N	Normoxie
NAD/H	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
Neh	Nrf2-ECH homology
NEMO	NF-κB Essential MODulator
NES	Nuclear Export Sequence
Nrf2	Nuclear factor-erythropoid 2p45 (NF-E2)-related factor 2

NFκB	Nuclear Factor-kappa B
NLS	Nuclear Localisation Sequence
NQO1	NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase 1
NTR	amino-Terminal Region
ODD	Oxygen-Dependent Degradation
PAS	PER-ARNT-SIM
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PFA	ParaFormAldéhyde
PHD	ProlylHyDroxylase
PI3K	PhosphoInositide 3-Kinase
PIB	Phosphatase Inhibitor Buffer
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PKD	Protein Kinase D
RE	Tampon de RESuspension
RHD	Rel Homology Domain
Rbx1	RING Box Protein 1
RL	Renilla Luciferase
ROS	Reactive Oxygen Species
Rpm	Rotations Par Minute
RT	Room Temperature
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SA	Tampon Salin
Ship1	SH2 domain-containing inositol-5'-phosphatase 1
SIN-1	3-morpholinosydnonimine
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SOD	SuperOxyde Dismutase
SRC-1	Steroïd Receptor Coactivator-1)
SV40	Simian Virus 40
Syk	Spleen tyrosine kinase
t-BHQ	tert-ButylHydroQuinone
TAD	TransActivation Domain
TCR	T-Cell Receptor
TIF-2	Transcription Intermediary Factor 2
TLR	Toll-Like Receptor
TNF-α	Tumour Necrosis Factor alpha
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VDAC	Voltage-Dependent Anion Chanel
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	von Hippel-Lindau
ZAP70	Zeta-chain (TCR) Associated Protein kinase 70kDa

Table des matières

I. INTRODUCTION	- 1 -
AVANT-PROPOS.....	- 1 -
1. L'HYPOXIE	- 1 -
1.1. Définition.....	- 1 -
1.2. Hypoxie chronique et hypoxie intermittente.....	- 2 -
1.3. Angiogenèse tumorale	- 3 -
1.3.1. Structure des vaisseaux tumoraux.....	- 4 -
1.4. Le facteur de transcription HIF-1	- 5 -
1.4.1. Structure	- 5 -
1.4.2. Régulation.....	- 5 -
1.4.3. Réponses cellulaires et physiologiques à l'hypoxie.....	- 7 -
2. LE STRESS OXYDATIF.....	- 8 -
2.1. Définition.....	- 8 -
2.2. Nrf2	- 11 -
2.2.1. Structure	- 11 -
2.2.2. Régulation.....	- 11 -
2.2.3. Gènes régulés par Nrf2	- 13 -
2.3. NFκB	- 13 -
2.3.1. Structure	- 13 -
2.3.2. Régulation.....	- 14 -
2.3.3. Gènes régulés par NFκB	- 16 -
3. OBJECTIFS	- 17 -
II. MATERIEL ET METHODES.....	- 18 -
1. CULTURE CELLULAIRE.....	- 18 -
1.1. Matériel.....	- 18 -
1.2. Méthode.....	- 18 -
2. INCUBATION SOUS HYPOXIE	- 18 -
2.1. Matériel (tableau II.1 et tableau II.2)	- 18 -
2.2. Méthode.....	- 18 -
3. IMMUNOFLUORESCENCE.....	- 19 -
3.1. Principe.....	- 19 -
3.2. Matériel (tableau II.3).....	- 19 -
3.3. Méthode.....	- 19 -
4. WESTERN BLOT	- 20 -
4.1. Principe.....	- 20 -
4.2. Extraction nucléaire.....	- 20 -
4.2.1. Matériel (tableau II.5).....	- 20 -
4.2.2. Méthode.....	- 20 -
4.3. Dosage de la concentration en protéines par la méthode de Bradford.....	- 21 -
4.3.1. Matériel (voir tableau II.6).....	- 21 -
4.3.2. Méthode.....	- 21 -
4.4. Dosage de la concentration en protéines par la méthode de Pierce	- 21 -
4.4.1. Matériel (voir tableau II.7).....	- 21 -
4.4.2. Méthode.....	- 21 -
4.5. Western blot	- 22 -
4.5.1. Matériel (voir tableau II.8 et II.9)	- 22 -
4.5.2. Méthode.....	- 22 -
5. ETUDE DE L'ACTIVITE DE LIAISON A L'ADN DE FACTEURS DE TRANSCRIPTION (TRANS-AM)	- 23 -
5.1. Principe.....	- 23 -
5.2. Extraction nucléaire.....	- 23 -
5.3. Dosage de la concentration en protéines par la méthode de Bradford.....	- 23 -
5.4. Dosage de la concentration en protéines par la méthode de Pierce	- 23 -
5.5. Dosage de l'activité de liaison du facteur de transcription étudié à l'ADN.	- 23 -
5.5.1. Matériel (voir tableau II.11 et II.12)	- 23 -
5.5.2. Méthode.....	- 23 -
6. ETUDE DE L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE PAR SYSTEMES RAPORTEURS	- 24 -
6.1. Principe.....	- 24 -
6.2. Matériel (tableau II.13 et II.14)	- 24 -

6.3.	<i>Méthode</i>	- 24 -
7.	ETUDE DE L'EXPRESSION DE GENES CIBLES PAR RT-PCR EN TEMPS REEL.....	- 25 -
7.1.	<i>Principe</i>	- 25 -
7.2.	<i>Extraction d'ARN total</i>	- 25 -
7.2.1.	Matériel (tableau II.15).....	- 25 -
7.2.2.	Méthode.....	- 25 -
7.3.	<i>Reverse Transcription</i>	- 26 -
7.3.1.	Matériel (tableau II.16).....	- 26 -
7.3.2.	Méthode.....	- 26 -
7.4.	<i>Real-time PCR</i>	- 26 -
7.4.1.	Matériel (tableau II.17 et II.18).....	- 26 -
7.4.2.	Méthode.....	- 26 -
8.	ETUDE DE L'EXPRESSION DE PROTEINES PAR TECHNIQUE ELISA.....	- 27 -
8.1.	<i>Principe</i>	- 27 -
8.2.	<i>Matériel (tableau II.19)</i>	- 27 -
8.3.	<i>Méthode</i>	- 27 -
9.	DOSAGE DE LA CONCENTRATION TOTALE EN PROTEINES PAR LA METHODE DU FOLIN.....	- 28 -
9.1.	<i>Matériel (tableau II.20)</i>	- 28 -
9.2.	<i>Méthode</i>	- 28 -
III.	RÉSULTATS	- 29 -
1.	MODÈLE EXPÉRIMENTAL.....	- 29 -
2.	HIF-1.....	- 30 -
2.1.	<i>Influence de l'hypoxie intermittente sur l'abondance nucléaire d'HIF-1</i>	- 30 -
3.	NRF2.....	- 30 -
3.1.	<i>Influence de l'hypoxie intermittente sur l'abondance nucléaire de Nrf2</i>	- 31 -
3.2.	<i>Influence de l'hypoxie intermittente sur la localisation subcellulaire de Nrf2</i>	- 31 -
3.3.	<i>Influence de l'hypoxie intermittente sur l'activité de liaison à l'ADN de Nrf2</i>	- 32 -
3.4.	<i>Etude de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription Nrf2 par système rapporteur</i>	- 32 -
3.5.	<i>Etude de l'expression de gènes cibles de Nrf2 par RT-PCR en temps réel</i>	- 33 -
3.6.	<i>Conclusion intermédiaire</i>	- 34 -
4.	NFκB.....	- 34 -
4.1.	<i>Influence de l'hypoxie intermittente sur l'abondance nucléaire de NFκB</i>	- 35 -
4.2.	<i>Influence de l'hypoxie intermittente sur la localisation subcellulaire de NFκB</i>	- 35 -
4.3.	<i>Influence de l'hypoxie intermittente sur l'activité de liaison à l'ADN de NFκB</i>	- 36 -
4.4.	<i>Etude de l'activité transcriptionnelle de NFκB par système rapporteur</i>	- 36 -
4.5.	<i>Etude de l'expression des gènes cibles de NFκB par RT-PCR en temps réel</i>	- 37 -
4.6.	<i>Etude de l'expression protéique d'IL-8, régulée par NFκB</i>	- 37 -
4.7.	<i>Conclusion intermédiaire</i>	- 38 -
IV.	DISCUSSION	- 39 -
1.	RÉGULATION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION HIF-1 PAR L'HYPOXIE INTERMITTENTE.....	- 39 -
2.	RÉGULATION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION NRF2 PAR L'HYPOXIE INTERMITTENTE.....	- 39 -
3.	RÉGULATION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION NFκB PAR L'HYPOXIE INTERMITTENTE.....	- 42 -
V.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	- 46 -
VI.	BIBLIOGRAPHIE	- 49 -

I. Introduction

Avant-propos

Le cancer reste actuellement l'une des maladies mortelles les plus fréquentes touchant des milliers de gens dans le monde. Dans l'avenir, on prévoit une augmentation du nombre de nouveaux cas de patients cancéreux ainsi que de la mortalité suite à un cancer. Ce dernier est un phénomène mondial touchant toutes les communautés même si des différences quant à la prévalence et aux types de cancer sont marquées parmi les populations (Schottenfeld et Beebe-Dimmer, 2006)

Le développement d'un cancer est un processus de transformation progressive d'une cellule normale en une cellule cancéreuse. Ainsi, une cellule acquiert un phénotype cancéreux grâce à une accumulation séquentielle de mutations génétiques. Celles-ci lui permettent d'acquérir les caractéristiques d'une cellule tumorale, essentielles à sa survie. Ces mutations touchent des gènes (proto-oncogènes et anti-oncogènes) codant pour des protéines impliquées dans la régulation de voies de signalisation importantes telles que la prolifération, la survie, l'apoptose,... (Hanahan et Weinberg, 2000 ; Schottenfeld et Beebe-Dimmer, 2006). La cellule ayant acquis un phénotype cancéreux sera capable de proliférer de manière incontrôlée et de donner naissance à une tumeur.

Le microenvironnement tumoral a un impact sur la croissance d'une tumeur puisqu'un environnement hypoxique favorise le processus angiogénique. En effet, l'angiogenèse est induite afin d'assurer la survie et la prolifération des cellules cancéreuses dans un environnement où la pression partielle en oxygène (pO_2) est faible (Toffoli et Michiels, 2008). Cet environnement hypoxique est dû à la prolifération rapide et au métabolisme élevé des cellules cancéreuses.

L'existence d'un flux sanguin irrégulier dans la tumeur, induisant des phases successives d'hypoxie et de réoxygénation représentatives de l'hypoxie intermittente, est connue depuis quelques années. L'hypoxie intermittente est impliquée dans la chimiorésistance et la radiorésistance des cellules tumorales. En effet, l'hypoxie intermittente protège les cellules tumorales contre les traitements anti-cancéreux et favorise également la croissance tumorale, le processus angiogénique, la formation de métastases. Ainsi, le développement d'une tumeur est influencé par l'hypoxie chronique et l'hypoxie intermittente (Toffoli et Michiels, 2008).

Nous avons poursuivi ce travail en tentant d'élucider les mécanismes cellulaires responsables de ces modifications phénotypiques dans les cellules cancéreuses. Afin de pouvoir mieux appréhender la partie expérimentale, nous introduisons tout d'abord les notions d'hypoxie et de stress oxydatif ainsi que les principaux facteurs de transcription activés dans ces conditions.

1. L'hypoxie

1.1. Définition

Le maintien d'un taux adéquat en oxygène dans les tissus est essentiel à la survie de l'ensemble des vertébrés. En effet, l'oxygène est utilisé comme accepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale pour la génération d'ATP (Adénosine TriPhosphate) mais il participe également à de nombreux processus enzymatiques nécessitant l'oxygène comme substrat. L'ATP est lui-même très important pour maintenir l'équilibre homéostatique au sein d'une cellule notamment via sa consommation par les pompes ioniques

telles que la Na^+/K^+ ATPase. Si l'équilibre ionique et osmotique au sein d'une cellule ne peut plus être assuré, une cascade de mécanismes mène à l'hydrolyse des composants intracellulaires et à la rupture de la membrane cellulaire. Ainsi, la cellule meurt par nécrose si elle devient incapable de s'adapter à une diminution de la pression partielle en oxygène (pO_2) ; elle est exposée à un phénomène d'hypoxie (figure I.1) (Michiels, 2004).

L'hypoxie apparaît dans les maladies vasculaires chroniques et aiguës, les maladies pulmonaires et le cancer. L'hypoxie au sein d'une tumeur est la conséquence physiopathologique d'un déséquilibre entre le taux de consommation cellulaire et la disponibilité de l'oxygène dans un tissu. Elle peut être induite par différents facteurs tels que des anomalies structurelles et fonctionnelles des vaisseaux sanguins tumoraux, une augmentation de la distance de diffusion de l'oxygène ou une réduction de la capacité de transport de l'oxygène suite à une anémie (Vaupel et Harrison, 2004). Un métabolisme élevé des cellules tumorales en prolifération est également un paramètre affectant la disponibilité en oxygène dans le tissu (Martinive et al., 2006). L'hypoxie tumorale joue un rôle très important dans la croissance cellulaire tumorale, la dissémination des cellules tumorales et la formation des métastases ainsi que dans la résistance à la chimiothérapie et la radiothérapie. Elle est également impliquée dans l'induction d'un phénotype tumoral plus agressif (Höckel et Vaupel, 2001).

Les cellules tumorales ont développé des mécanismes d'adaptation leur permettant de survivre et de proliférer dans un environnement hypoxique. L'induction de ces mécanismes implique la régulation de l'expression de différents gènes. La pO_2 moyenne dans un tissu normal dépasse habituellement 20 mmHg. Ainsi, lorsque la pO_2 est en-dessous de 10 mmHg, les cellules augmentent l'expression de gènes régulés par un facteur de transcription appelé HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1). Ces gènes sont impliqués notamment dans l'activation du métabolisme anaérobie, la production de l'érythropoïétine, la synthèse de facteurs de croissance favorisant l'angiogenèse et la régulation des mécanismes de résistance aux thérapies anticancéreuses (Dewhirst et al., 2008).

1.2. Hypoxie chronique et hypoxie intermittente

Au cours de sa croissance, la masse tumorale peut être exposée à deux types d'hypoxie : l'hypoxie chronique ou l'hypoxie intermittente. La première est liée à la limite de diffusion de l'oxygène, tandis que la deuxième est la conséquence des fluctuations du flux sanguin tumoral.

Plus les cellules tumorales composant la tumeur prolifèrent, plus la distance entre ces cellules et les vaisseaux sanguins augmente. La distance de diffusion de l'oxygène étant de 100 à 150 μm depuis le réseau vasculaire vers les tissus normaux et tumoraux, les cellules tumorales localisées au-delà de cette distance entrent donc en hypoxie puisque la pression partielle en oxygène devient proche de zéro (figure I.2). Par ailleurs, les cellules tumorales en prolifération sont métaboliquement très actives, ce qui entraîne une augmentation de la consommation en oxygène au sein de la masse tumorale. Ainsi, une prolifération incontrôlée des cellules tumorales demande un apport toujours plus important en oxygène vers la tumeur dont la croissance est trop rapide pour permettre un approvisionnement en oxygène et en nutriments suffisant. C'est l'hypoxie chronique (Brown, 1990 ; Carmeliet et Jain, 2000 ; Harris, 2002).

La diminution de la pression partielle en oxygène au sein de la tumeur, suite à son accroissement trop rapide, est perçue par l'environnement tumoral comme un signal d'activation de l'angiogenèse (Berta et al., 2004). Suite à ce processus, un nouveau réseau

vasculaire tumoral se met en place afin de restaurer l'apport en oxygène et en nutriments. Cependant ce réseau présente des anomalies structurelles et fonctionnelles qui sont à l'origine de l'occlusion transitoire des vaisseaux sanguins et donc des fluctuations du flux sanguin tumoral au sein de la tumeur. Ces fluctuations sont, quant à elles, responsables de l'apparition de phases répétées d'hypoxie et de réoxygénation, l'hypoxie intermittente (ou cyclique), affectant aussi bien les cellules endothéliales que les cellules cancéreuses. Lors de l'occlusion transitoire des vaisseaux sanguins, les cellules tumorales en aval de ces vaisseaux sont exposées aux conditions d'hypoxie. La réouverture des vaisseaux sanguins permettra la réoxygénation de la masse tumorale hypoxique. Le flux sanguin tumoral est très variable d'une tumeur à l'autre mais également au sein d'une même tumeur (Brown, 1990 ; Toffoli et Michiels, 2008). Les fluctuations du flux sanguin tumoral se produisent sur deux échelles de temps dominantes. La première a une fréquence de quelques cycles par heure tandis que la deuxième montre des fluctuations s'étendant de quelques heures à quelques jours (Dewhirst et al., 2008).

1.3. Angiogenèse tumorale

Une cellule normale devient cancéreuse suite à l'accumulation de toute une série de mutations successives qui lui permettront de devenir indépendante vis-à-vis des facteurs de croissance, insensible aux facteurs inhibiteurs de croissance ainsi qu'à l'apoptose, de se répliquer de manière illimitée et de former des métastases (Hanahan et Weinberg, 2000). Bien que nécessaires, ces caractéristiques ne sont pas suffisantes pour permettre à la cellule cancéreuse de proliférer en une population de cellules tumorales cliniquement détectable, métastatique et létale. La tumeur doit être capable d'initier le processus de l'angiogenèse afin de développer un phénotype malin. De cette façon, elle assurera un apport en nutriments et en oxygène aux cellules tumorales en croissance (Naumov et al., 2006).

Lors du développement embryonnaire, le réseau vasculaire est formé suite à la différenciation de précurseurs endothéliaux (ou angioblastes) en cellules sanguines et en cellules endothéliales matures, c'est la vasculogénèse. Une fois le plexus capillaire primaire établi, de nouveaux vaisseaux sanguins se développent par germination à partir du réseau primitif préexistant, c'est l'angiogenèse. Ainsi, un système vasculaire hautement organisé et fonctionnel est mis en place.

L'angiogenèse est donc la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un réseau vasculaire pré-existant. Ce processus dynamique est finement régulé par un équilibre entre des molécules pro-angiogéniques et des molécules anti-angiogéniques (Liao et Johnson, 2007). L'angiogenèse a lieu lors de processus physiologiques comme le développement embryonnaire, l'ovulation, la gestation, le cycle reproductif de la femme, le processus de cicatrisation mais elle peut également être initiée en conditions pathologiques telles que le cancer (Webb et Vande Woude, 2000). Ainsi, le réseau vasculaire reste stable mais il peut subir une réorganisation lors d'un processus pathologique suite à un déséquilibre entre les molécules pro-angiogéniques et anti-angiogéniques. Ce déséquilibre favorisera l'initiation de l'angiogenèse tumorale (Berta et al., 2004). Dans le cancer, la formation d'un système vasculaire tumoral est très important afin d'assurer la croissance de la masse tumorale. En effet, les vaisseaux sanguins tumoraux apportent l'oxygène et les nutriments essentiels à la survie et la prolifération des cellules tumorales. Par ailleurs, ils favorisent également la dissémination des cellules tumorales vers d'autres tissus (Webb et Vande Woude, 2000). Le passage d'un phénotype non-angiogénique vers un phénotype angiogénique est très important pour la progression du cancer, c'est le switch angiogénique. Si une tumeur ne parvient pas à recruter des cellules endothéliales microvasculaires ou à réorganiser le réseau vasculaire

environnant existant, il en résultera une masse tumorale de phénotype non-angiogénique de taille microscopique (Naumov et al., 2006).

L'angiogenèse tumorale est un processus biologique impliquant plusieurs étapes. Les vaisseaux sanguins se dilatent et subissent un détachement des péricytes ainsi qu'une dégradation de la membrane basale. Cette étape induit l'extravasation de protéines du plasma et la formation d'un réseau matriciel nécessaire à la migration des cellules endothéliales. Par conséquent, les vaisseaux sanguins sont déstabilisés. Suite à la perte de leurs contacts cellulaires, les cellules endothéliales prolifèrent et migrent, dirigées par un stimulus angiogénique, des facteurs chimiotactiques angiogéniques, tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) par exemple. Ces facteurs chimiotactiques angiogéniques sont notamment exprimés par les cellules tumorales exposées aux conditions d'hypoxie (Liao et Johnson, 2007).

1.3.1. Structure des vaisseaux tumoraux

Les vaisseaux sanguins tumoraux nouvellement formés afin d'irriguer la masse tumorale sont structurellement et fonctionnellement anormaux. Du point de vue structurel, ces vaisseaux sanguins sont tortueux, dilatés et présentent un diamètre irrégulier. Ils sont également caractérisés par la présence d'extrémités aveugles ainsi que de nombreux branchements (figure I.3) (Carmeliet et Jain, 2000). Une autre de leurs caractéristiques est leur haute perméabilité puisque la membrane basale est absente ou discontinue. De plus, ces vaisseaux sanguins sont formés d'une monocouche endothéliale défectueuse augmentant encore leur perméabilité. Si certains vaisseaux tumoraux présentent des cellules endothéliales normales, d'autres sont constitués de cellules endothéliales morphologiquement anormales. Elles prolifèrent en se chevauchant les unes les autres et se projettent dans la lumière des vaisseaux. Ce phénomène a notamment été mis en évidence expérimentalement dans des carcinomes de glande mammaire de souris MCa-IV (Hashizume et al., 2000). La perméabilité des vaisseaux sanguins tumoraux peut faciliter le transport des cellules tumorales dans le sang et donc la formation de métastases. La présence d'une monocouche endothéliale anormale a des implications importantes dans le cadre des traitements macromoléculaires du cancer dont l'efficacité dépend de la perméabilité des vaisseaux sanguins.

Par conséquent, ces différentes anomalies structurelles sont à l'origine d'un flux sanguin tumoral irrégulier au sein de la tumeur. Les cellules tumorales sont exposées à l'hypoxie intermittente, des phases répétées d'hypoxie suivies de réoxygénation. Ces conditions d'hypoxie intermittente contribuent à diminuer l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques et radiothérapeutiques. En effet, la diminution transitoire du flux sanguin tumoral diminue l'accès des agents anticancéreux aux cellules tumorales mais elle réduit également la sensibilité de ces cellules à la radiothérapie puisque la pression partielle en oxygène devient faible. Elles favorisent également la sélection de cellules cancéreuses possédant un niveau de malignité et un potentiel métastatique plus élevés. De plus, l'hypoxie intermittente sélectionnerait l'expansion clonale de cellules ayant perdu la réponse apoptotique à l'hypoxie. Les tumeurs exposées à l'hypoxie intermittente semblent également plus invasives (Carmeliet et Jain, 2000 ; Toffoli et Michiels, 2008).

1.4. Le facteur de transcription HIF-1

1.4.1. Structure

HIF-1 est un facteur de transcription composé de deux sous-unités, HIF-1 α (120 kDa) et ARNT (Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) ou HIF-1 β (94 kDa), appartenant à la famille des facteurs de transcription bHLH/PAS. Ces deux sous-unités possèdent un domaine bHLH (basic Helix Loop Helix) ainsi qu'un domaine PAS (PER-ARNT-SIM), le premier domaine étant impliqué dans la dimérisation des deux monomères. Le deuxième domaine intervient dans la fixation et la spécificité de la liaison à l'ADN.

Les deux sous-unités sont constitutivement exprimées. La sous-unité ARNT est localisée dans le noyau. Dans le cytosol, l'activation et la translocation nucléaire de HIF-1 α dépend de la pression partielle en oxygène. Tandis que le taux d'ARNm de HIF-1 α est constant en normoxie et en hypoxie, la protéine est rapidement dégradée en normoxie alors qu'elle s'accumule en hypoxie. Deux domaines de transactivation (TAD ; TransActivation Domain) aux extrémités N- et C-terminales du monomère ainsi qu'un domaine ODD (Oxygen-Dependent Degradation) jouent un rôle important dans la régulation de HIF-1 α via la pression partielle en oxygène. La sous-unité HIF-1 α est constituée de 826 aa. Le gène *hif-1 α* , localisé sur le chromosome 14 (14q21-q24), est constitué de 15 exons chez l'homme. Il existe trois isoformes de la sous-unité α : HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α (Berta et al., 2004 ; Michiels, 2004 ; Ruas et Poellinger, 2005). La représentation schématique de la structure de la sous-unité HIF-1 α est présentée à la figure I.4.

1.4.2. Régulation

Le facteur de transcription HIF-1 est activé en réponse à une faible pression partielle en oxygène. Il contribue à l'initiation de nombreux processus biologiques permettant à la cellule de s'adapter à un environnement dit hypoxique. Son activité est dépendante de la stabilité de la sous-unité HIF-1 α qui est elle-même affectée par la pression partielle en oxygène. La régulation de HIF-1 s'effectue principalement au niveau de HIF-1 α et ceci à différents niveaux : la stabilité protéique, les modifications post-traductionnelles, la translocation nucléaire, la dimérisation, l'activation transcriptionnelle et l'interaction avec d'autres protéines. Par ailleurs, des modifications de l'expression des ARNm et de l'épissage alternatif des sous-unités HIF-1 α et ARNT ont été également observées (Zagorska et al., 2004).

En conditions de normoxie, le gène *hif-1 α* est continuellement transcrit et traduit en protéine HIF-1 α , elle-même ciblée vers le protéasome 26S et dégradée. Sa durée de demi-vie est inférieure à 5 minutes. Cette dégradation a lieu à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (Berta et al., 2004). Elle est initiée suite à l'action des prolyl-4-hydroxylases dont l'activité est dépendante de l'oxygène. Ces enzymes hydroxylent les résidus prolines 402 et 564 du domaine ODD d'HIF-1 α (Zagorska et al., 2004). Trois isoformes de prolyl-4-hydroxylases modifiant post-traductionnellement HIF-1 α ont pu être identifiées : PHD1, PHD2 et PHD3. Elles diffèrent toutes les trois par leur localisation intracellulaire puisque PHD1 est localisée exclusivement dans le noyau, PHD2 principalement dans le cytoplasme, alors que PHD3 montre une localisation nucléaire et périnucléaire (Ruas et Poellinger, 2005). L'hydroxylation de HIF-1 α est essentielle pour la reconnaissance et la liaison du domaine β de la protéine VHL (von Hippel-Lindau) au domaine ODD hydroxylé. La protéine VHL, forme avec les protéines élongines B et C, Culline 2 et Rbx1 (RING Box Protein 1), un complexe protéique ubiquitine ligase E3 qui est impliqué dans l'ubiquitinylation du domaine ODD de HIF-1 α .

L'ubiquitinylation de la sous-unité induit sa dégradation protéasomale (figure I.5) (Zagorska et al., 2004).

En présence de l'oxygène, une autre enzyme, nommée FIH-1 (Factor-Inhibiting HIF-1 α), affecte la fonction transactivatrice de HIF-1 α . En effet, son action est d'hydroxyler le résidu asparagine 803 du domaine de transactivation carboxy-terminal. Cette modification post-traductionnelle empêche toute interaction entre HIF-1 α et le coactivateur transcriptionnel CBP (CREB (cAMP Response Element-Binding protein)-binding protein)/p300. L'action de la protéine FIH-1 a pour conséquence d'inhiber l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α en normoxie (figure I.6). Ainsi, les prolyl hydroxylases et la FIH-1 sont considérés comme des « senseurs » essentiels de l'oxygène (Berta et al., 2004 ; Zagorska et al., 2004 ; Lisy et Peet, 2008).

En conditions d'hypoxie, la sous-unité HIF-1 α s'accumule dans le cytoplasme car elle n'est plus ciblée vers le protéasome pour sa dégradation. En effet, l'oxygène moléculaire étant utilisé comme co-substrat par les prolyl-4-hydroxylases, une diminution de la pression partielle en oxygène dans les tissus induit une diminution de leur activité. Par conséquent, la sous-unité HIF-1 α est stabilisée et est transloquée dans le compartiment nucléaire où elle dimérise avec la sous-unité ARNT afin de former l'hétérodimère HIF-1 (figure I.5) (Berta et al., 2004). La formation de l'hétérodimère est très importante dans sa liaison au promoteur de ses gènes cibles et son activité transcriptionnelle. HIF-1 se lie au promoteur de gènes cibles via un site de liaison consensus HBS (HIF-Binding Site) localisé au sein d'une séquence de reconnaissance HRE (Hypoxia Response Element) (Zagorska et al., 2004).

L'activité transcriptionnelle complète de HIF-1 nécessite, en plus de sa liaison à l'ADN, son interaction avec des coactivateurs transcriptionnels tels que CBP/p300, SRC-1 ou TIF-2 (Transcription Intermediary Factor 2). Seule une interaction directe a été démontrée entre HIF-1 α et CBP/p300. Ces coactivateurs favorisent l'expression des gènes cibles en modulant, par exemple, la structure de la chromatine. C'est le cas du cofacteur CBP/p300 possédant une activité histone acétyltransférase et interagissant, via son domaine CH1, avec le domaine de transactivation carboxy-terminal de HIF-1 α . CBP et p300 sont des coactivateurs transcriptionnels paralogues. L'acétylation des histones par CBP/p300 permet le relâchement de la structure de la chromatine afin de rendre celle-ci accessible aux facteurs de transcription. Ce coactivateur serait également impliqué dans l'acétylation directe de facteurs de transcription. En sachant que HIF-1 α pourrait être acétylé par CBP/p300, ceci fournirait un autre niveau de régulation de la sous-unité (Wenger, 2002 ; Ruas et Poellinger., 2005 ; Lisy et Peet, 2008). Par ailleurs, CBP/p300 peut recruter d'autres coactivateurs tels que SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator-1) via son domaine C-terminal afin de favoriser l'activation complète de HIF-1. SRC-1 est une protéine premièrement identifiée comme un coactivateur des récepteurs aux hormones stéroïdiennes. Elle aurait un rôle important dans les interactions entre les facteurs de transcription et la machinerie basale de transcription afin de stimuler l'expression génique. De plus, SRC-1 possède une activité histone acétyltransférase intervenant dans le remodelage de la structure chromatidienne pour une meilleure accessibilité de la machinerie de transcription à l'ADN (Carrero et al., 2000).

La formation de l'hétérodimère HIF-1 et sa liaison à l'ADN ne sont pas suffisantes à la transactivation des gènes cibles du facteur de transcription. L'interaction entre HIF-1 et les coactivateurs transcriptionnels est nécessaire afin d'induire l'activité transcriptionnelle de HIF-1 et donc l'initiation de l'expression des gènes qu'il régule. D'autres mécanismes peuvent également intervenir dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 tels que la phosphorylation de la sous-unité HIF-1 α par des kinases dont la protéine kinase A (Toffoli et al., 2007). Lorsque l'activation de HIF-1 est complète, il induit l'expression de

gènes HRE possédant au moins un HRE dans leur promoteur. Ainsi, l'activation de HIF-1 permet aux cellules tumorales de survivre dans des conditions de pression partielle faible en oxygène, via la régulation de mécanismes biologiques cellulaires d'adaptation tels que l'angiogenèse, l'érythropoïèse, la glycolyse, le métabolisme du fer, la survie cellulaire,...

La figure I.7 montre une vue d'ensemble de la régulation de la sous-unité HIF-1 α en conditions de normoxie et d'hypoxie.

1.4.3. Réponses cellulaires et physiologiques à l'hypoxie

En conditions d'hypoxie, différents mécanismes d'adaptation se mettent en place afin d'assurer la survie et l'adaptation des cellules tumorales à la diminution de la pression partielle en oxygène. Ces mécanismes biologiques concernent un ensemble de gènes qui sont régulés par le facteur de transcription HIF-1. Celui-ci est le régulateur majeur de la réponse cellulaire hypoxique. Grâce à l'activation de ces processus biologiques, la dépendance à l'oxygène et la consommation de l'oxygène par les cellules seront diminuées, tandis que la distribution de l'oxygène vers les cellules sera améliorée.

Ainsi, au niveau cellulaire, la redistribution de l'énergie cellulaire entre les processus biologiques les plus grands consommateurs d'ATP, essentiels et non-essentiels, est favorisée pour la survie de la cellule tumorale. Des processus tels que la synthèse protéique sont inhibés au bénéfice d'autres tels que le maintien de l'homéostasie ionique, ce phénomène est appelé la suppression métabolique (Michiels, 2004).

De plus, en réponse à l'hypoxie, l'ATP n'est plus produit à partir de la voie mitochondriale dépendante de l'oxygène mais grâce à la voie glycolytique indépendante de l'oxygène. La glycolyse fournit moins de molécules d'ATP que la phosphorylation oxydative, 2 molécules d'ATP par molécule de glucose lors de la glycolyse contre 38 molécules d'ATP pour la phosphorylation oxydative. Néanmoins, la glycolyse est capable de maintenir la production en ATP en présence d'une quantité suffisante en glucose et grâce à une augmentation de l'activité des enzymes glycolytiques. L'expression des enzymes de la voie glycolytique ainsi que des transporteurs de glucose GLUT1 (Glucose Transporter) et GLUT3 est régulée par HIF-1 (Harris, 2002 ; Michiels, 2004).

Au niveau physiologique, la surexpression de gènes codant pour des facteurs clés qui interviennent dans des mécanismes cellulaires comme la glycolyse, l'érythropoïèse, l'angiogenèse, le métabolisme du fer,... permet l'adaptation à plus long terme des cellules tumorales à l'hypoxie. L'expression de ces gènes est régulée par le facteur de transcription HIF-1 activé par une faible pression partielle en oxygène. La production d'ATP par la voie glycolytique est augmentée suite à la surexpression des enzymes de la glycolyse. Ceci induit une production suffisante en ATP afin d'assurer la survie et la prolifération de la cellule tumorale. Afin d'améliorer la capacité de transport de l'oxygène, l'hypoxie favorise l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du fer et dans l'érythropoïèse. Le fer est un facteur limitant dans l'érythropoïèse puisqu'il est un constituant important du groupement hème de l'hémoglobine dans les globules rouges. L'hypoxie favorise l'expression de la transferrine qui transporte le fer vers les cellules. Le récepteur de la transferrine est également un gène cible de HIF-1. L'hypoxie augmente également l'expression de l'érythropoïétine, importante dans la production des globules rouges. La production élevée de globules rouges améliore l'approvisionnement des tissus en oxygène. L'apport en nutriments et en oxygène depuis les capillaires vers la tumeur est améliorée via l'initiation de l'angiogenèse. En effet, en hypoxie, des molécules pro-angiogéniques telles que le VEGF et le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) sont surexprimées. Ainsi, l'angiogenèse induit une augmentation de la densité vasculaire et donc augmente l'apport en sang au sein de la masse tumorale. (Wenger, 2002 ; Michiels, 2004).

2. Le stress oxydatif

2.1. Définition

L'oxygène moléculaire, O_2 , est une molécule diatomique possédant deux électrons non pairés et lui conférant donc la propriété d'un radical non-instable (Chandel et Budinger, 2007). Il peut être à la fois bénéfique et toxique pour les organismes. En effet, s'il est essentiel comme accepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale pour la génération d'ATP, il peut être également converti, de par sa nature radicalaire, en espèces oxygénées réactives (les ROS-Reactive Oxygen Species) et instables. Ces ROS incluent notamment l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyl (OH^{\cdot}) (Poyton et al., 2009). La dismutation spontanée de l'anion superoxyde résulte en la formation de H_2O_2 . Cette réaction est catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) dont les cellules mammaliennes possèdent trois isoformes : SOD1 (CuZn-SOD), SOD2 (Mn-SOD) et SOD3 (EC-SOD) (Chandel et Budinger, 2007).

Alors que les ROS induisent de nombreux dommages oxydatifs au niveau de la cellule, ces espèces moléculaires peuvent également avoir un rôle bénéfique dans différentes voies de signalisation.

A concentrations élevées, leur structure chimique leur conférant une haute instabilité, les ROS sont capables d'interagir avec les protéines, les acides nucléiques, les polysaccharides et les lipides et de les oxyder. Les dommages oxydatifs apparaissant au niveau de l'ADN nucléaire et de l'ADN mitochondrial se traduisent par exemple par une accumulation de 8-hydroxydeoxyguanosines, cette lésion est facilement formée et mutagénique. C'est un biomarqueur de la carcinogénèse. La modification de l'ADN suite aux dommages oxydatifs est la première étape impliquée dans la mutagénèse, la carcinogénèse et le vieillissement. Les dommages à l'ADN incluent des cassures simples ou doubles brins, la modification des purines, pyrimidines et désoxyriboses ainsi que les « cross-links ». Ils peuvent provoquer un arrêt ou l'induction de la transcription, l'induction de voies de transduction du signal, des erreurs de réplication et des instabilités génomiques (Valko et al, 2007 ; Poyton et al., 2009). Au niveau des protéines, le stress oxydatif induit par l'hypoxie favorise la carbonylation des protéines (l'ajout d'un groupement carbonyle ($C=O$)). Le taux de protéines carbonylées augmente dans les cellules exposées à l'hypoxie. Les protéines interviennent dans de nombreux processus biologiques cellulaires, la modification de leur structure peut donc avoir des effets néfastes sur la survie des cellules. Le radical hydroxyl peut également interagir avec les résidus d'acides gras insaturés des phospholipides dans les membranes plasmiques. L'un des produits majeurs de la peroxydation des lipides est l'hydroxynonanal qui affecte l'activité de diverses protéines membranaires (Poyton et al., 2009).

A plus faibles concentrations ou à concentrations modérées, les ROS peuvent agir comme molécules signal dans diverses voies de signalisation incluant la régulation du cycle cellulaire, de la prolifération, de l'apoptose, de la différenciation, des facteurs de transcription. Ils interviennent également dans la défense contre les agents infectieux (Valko et al, 2007).

Le site majeur de la production de ROS intracellulaire est la chaîne respiratoire mitochondriale. Ainsi, 1 à 2 % de l'oxygène consommé au cours de la respiration est partiellement réduit en anions superoxyde. Ceux-ci seraient majoritairement produits au niveau des complexes I et III de la chaîne de transport des électrons (figure I.8). Des électrons sont perdus au cours du transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire mitochondriale et sont transférés directement à l'oxygène moléculaire. La chaîne respiratoire mitochondriale, localisée dans la membrane interne mitochondriale, est composée de quatre complexes

protéiques membranaires (complexes I-IV) ainsi que du coenzyme Q et du cytochrome C (une protéine périphérique se liant en surface externe de la membrane interne mitochondriale). Le complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase) accepte les électrons du NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) et le complexe II (succinate déhydrogénase) accepte les électrons provenant du succinate. Les électrons sont transmis ensuite au coenzyme Q (ubiquinone) puis vers le complexe III (ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase). Enfin, le complexe IV (cytochrome c oxydase) reçoit les électrons grâce au cytochrome c. En fin de chaîne respiratoire mitochondriale, l'oxygène moléculaire (l'accepteur final) accepte quatre électrons et est réduit en H₂O.

Le complexe III produirait l'anion superoxyde par auto-oxydation de l'ubisemiquinone (QH[•]) formée lors du cycle Q (figure I.9). L'anion superoxyde peut être généré sur deux sites, le site Qo et Q1. Une fois formé par le complexe I et III, l'O₂^{•-} peut être libéré dans la matrice ou dans l'espace intermembranaire. Les anions superoxyde ainsi générés peuvent être dismutés en H₂O₂ par une superoxyde dismutase localisée dans la matrice (SOD2) ou l'espace intermembranaire (SOD1). Ils peuvent être également libérés dans le cytosol via le canal à anion voltage-dépendant (VDAC ; Voltage-Dependent Anion Channel) ou le pore de transition de perméabilité mitochondriale (MPTP) (Poyton et al., 2009).

L'hypoxie chronique et l'hypoxie intermittente peuvent toutes deux être à l'origine d'une augmentation de la production de ROS. Pendant l'hypoxie intermittente, les ROS peuvent être produits aussi bien pendant les périodes d'hypoxie que pendant les périodes de réoxygénation. Si plusieurs études ont déjà rapporté que l'exposition de cellules ou de tissus à l'hypoxie augmente le stress oxydatif (Guzy et al., 2005 ; Chandel et Budinger 2007), la relation entre l'hypoxie et la production de ROS reste controversée. Des études (Kwast et al., 1999) ont montré que ces ROS (ou RNS) seraient produits par la mitochondrie. Les mécanismes par lesquels les concentrations réduites en oxygène augmentent la production de ROS par la mitochondrie ne sont pas encore connus. Ce phénomène présente un paradoxe puisque la production d'anions superoxyde dépend directement de la concentration en oxygène et de la concentration en donneurs d'électrons réduits (Poyton et al., 2009). Or, en hypoxie, la pression partielle en oxygène, un substrat dans la production de ROS, est réduite. D'autres facteurs seraient donc également impliqués dans les mécanismes moléculaires de la production mitochondriale de ROS. Trois mécanismes potentiels pourraient expliquer l'augmentation du stress oxydatif en hypoxie. La première hypothèse concerne la génération de ROS par le complexe III et leur libération soit dans l'espace intermembranaire, soit dans la matrice. L'oxygène moléculaire présent dans la bicouche lipidique de la membrane mitochondriale peut altérer l'équilibre dans la libération des ROS, ceci de telle façon qu'une plus grande quantité de ROS est libérée dans l'espace intermembranaire plutôt que dans la matrice. Le mécanisme responsable de ce processus n'est pas encore connu mais il pourrait expliquer l'augmentation du stress oxydatif dans le cytosol en hypoxie. La deuxième hypothèse concerne le temps de vie de l'ubisemiquinone (QH[•]). Si le transfert d'électrons depuis l'ubisemiquinone vers le cytochrome B est ralenti en hypoxie, la production d'anions superoxyde peut être augmentée même si la concentration en oxygène est faible (figure I.9). L'oxygène moléculaire est capable de capturer les électrons de l'ubisemiquinone. La troisième hypothèse implique l'augmentation de l'accès de l'oxygène moléculaire à l'ubisemiquinone dans le complexe III (Guzy et Shumacker, 2006).

Un autre radical libre, l'oxyde nitrique (NO[•]), peut être produit par la cytochrome c oxydase de la chaîne respiratoire mitochondriale à partir du nitrite (NO₂⁻) en présence de faibles concentrations en oxygène. Une autre hypothèse est donc que le radical libre majoritairement produit en conditions hypoxiques serait le peroxynitrite (ONOO[•]) à partir des anions superoxyde générés par la mitochondrie et de l'oxyde nitrique. Il s'avère que les

concentrations en peroxynitrite dépendent de la concentration en oxygène et augmentent en conditions hypoxiques. Ainsi, la cytochrome c oxydase (Cco) posséderait deux activités enzymatiques : l'activité réductase Cco/NO[•] est favorisée par des concentrations croissantes en NO₂⁻ et un pH faible (une condition rencontrée lors de l'hypoxie). Sous cette activité, la Cco catalyse la réduction du NO₂⁻ en NO[•] en présence de faibles concentrations en oxygène. Sous l'activité réductase Cco/H₂O, la Cco catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en H₂O en présence de l'oxygène (Castello et al., 2008 ; Poyton et al., 2009) (figure I.10). On peut constater que la pression partielle en oxygène a un impact sur la nature du radical libre produit par la mitochondrie. En conditions de normoxie (20-130 µM O₂), l'anion superoxyde est le radical majoritairement produit. Le peroxynitrite est produit essentiellement en conditions d'hypoxie (2-20 µM O₂), tandis que l'oxyde nitrique est généré en conditions d'anoxie (moins de 2 µM O₂) (figure I.11).

Il existe également d'autres sources cellulaires de ROS telles que la xanthine oxydase catalysant l'hydroxylation des purines. Les radicaux libres produits lors de cette réaction sont l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. Les neutrophiles génèrent également des ROS lors de la destruction d'agents pathogènes. La NAD(P)H oxydase qu'ils expriment produit des anions superoxyde lors de la phagocytose. L'oxydation d'acides gras par les peroxysomes est également une source de ROS, dont dans ce cas-ci de peroxyde d'hydrogène. Les ROS peuvent être également générés via une exposition à diverses sources exogènes telles que les composés chlorés, les radiations, les barbituriques (Valko et al., 2006).

L'exposition continue aux radicaux libres a mené les organismes à développer des mécanismes de défense antioxydants incluant des mécanismes de prévention, des mécanismes de réparation, des défenses physiques et des défenses antioxydantes. Ainsi, en conditions physiologiques normales, un équilibre est établi entre le taux de production et de neutralisation des radicaux libres par des antioxydants enzymatiques ou non-enzymatiques afin de maintenir l'équilibre rédox au sein de la cellule. Les antioxydants enzymatiques incluent la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathione peroxydase. L'acide ascorbique, le glutathion, les caroténoïdes, les flavonoïdes,... font partie des antioxydants non-enzymatiques. Malgré ces mécanismes de défense antioxydants mis en place par les cellules afin de contrecarrer les dommages oxydatifs engendrés par les ROS sur les composants cellulaires, des dommages peuvent s'accumuler et jouer un rôle dans le développement de maladies liées à l'âge telles que le cancer, l'athérosclérose, l'arthrite, les désordres neurodégénératifs,...

Lorsqu'ils sont produits en excès et s'accumulent dans la cellule, les ROS peuvent provoquer la mort cellulaire ou nécrose si la réponse antioxydante n'est pas assez efficace. L'excès de ROS se traduit par l'apparition d'un stress oxydatif dans la cellule. L'équilibre rédox est alors rompu puisque les ROS s'accumulent et ne peuvent plus être neutralisés par les antioxydants. Le stress oxydatif peut se produire suite à une accumulation des ROS ou une diminution de l'activité des antioxydants. L'équilibre entre les activités et les taux intracellulaires des antioxydants est très important pour l'homéostasie rédox (Valko et al., 2007).

L'exposition des cellules au stress oxydatif induit l'expression de plus d'une centaine de gènes de défense qui interviennent dans la détoxification des ROS et dans la prévention d'un stress oxydatif. Leurs produits régulent diverses activités cellulaires dont la transduction du signal, la prolifération et des réactions de défense immunologique. L'ensemble de ces gènes est régulé par des facteurs de transcription dont l'activation est dépendante de la concentration en ROS. Il s'agit par exemple de Nrf2 et de NF-κB, deux facteurs de transcription plus particulièrement étudiés lors de ce mémoire (Niture et al., 2010).

2.2. Nrf2

Lors d'un faible stress oxydatif, les cellules expriment un ensemble de gènes codant pour des enzymes de détoxification et des enzymes antioxydantes. Ces protéines permettront à la cellule de neutraliser efficacement et de réduire l'excès de ROS afin de restaurer l'équilibre redox. L'expression de ces enzymes de détoxification et antioxydantes est régulée par un facteur de transcription clé de la réponse cellulaire antioxydante, Nrf2 [Nuclear factor-erythropoietic 2p45 (NF-E2)-related factor 2]. Il est activé par un faible stress oxydatif et induit l'expression de ses gènes cibles par la reconnaissance de séquences ARE (Antioxidant Response Element) localisées dans le promoteur de ces gènes.

2.2.1. Structure

Nrf2 appartient à la famille des protéines basic leucine zipper (bZIP). Il comporte six domaines Neh (Nrf2-ECH homology) (Neh1 à Neh6). Neh1 contient une région Cap'N'Collar hautement conservée (CNC), une région basique intervenant dans la liaison à l'ADN et une région leucine zipper. Ce domaine Neh1 est important pour la liaison de Nrf2 avec les petites protéines Maf dans le noyau. Le domaine Neh6 contient une région conservée riche en sérines. Les domaines Neh4 et Neh5 contiennent des domaines de transactivation interagissant avec des coactivateurs transcriptionnels tels que les protéines CBP/p300. Le domaine Neh2, localisé à l'extrémité N-terminale, intervient dans la régulation négative de Nrf2 en condition normale (Tong et al., 2006 ; Li et Kong, 2009) (figure I.12).

2.2.2. Régulation

La régulation de Nrf2 en condition basale et en présence d'un stress oxydatif n'a pas encore été complètement élucidée, cependant un mécanisme général de régulation a été accepté. Ce mécanisme suggère que l'activité de Nrf2 est régulée négativement par la protéine cytosolique Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) et est induite en présence d'un faible stress oxydatif. Keap1 est constituée de 5 domaines : une région NTR (amino-Terminal Region), un domaine BTB (Broad complex, Tramtrack, Bric-a-brac), un domaine IVR (InterVening Region), un domaine DGR (Double Glycin Repeat) (ou Kelch) et un domaine CTR (Carboxyl Terminal Region) (figure I.13) (Li et Kong, 2009 ; Niture et al, 2010). Le domaine BTB joue un rôle important dans la fonction de Keap1. Keap1 est localisée principalement dans le cytoplasme où elle interagit avec les filaments d'actine du cytosquelette via le domaine DGR (Kang et al., 2004). En condition basale, un dimère de protéines Keap1 séquestre une protéine Nrf2 dans le cytoplasme. La liaison s'établirait entre deux motifs (d'affinité différente) du domaine Neh2 et les domaines DGR et CTR de Keap1 : le motif ETGE, d'affinité élevée, essentiel pour l'interaction entre Keap1 et Nrf2 et le motif DLG, de faible affinité, intervenant dans le positionnement optimal des résidus lysines ciblés pour l'ubiquitinylation. Ce motif DLG est donc impliqué dans la dégradation de Nrf2 (figure I.14). L'interaction entre Nrf2 et Keap1 permet à Keap1 de réguler le turn-over de Nrf2 via l'ubiquitinylation et la dégradation protéasomale du facteur de transcription en condition basale (Tong et al., 2006 ; Copple et al., 2008).

En plus de séquestrer Nrf2 dans le cytoplasme, Keap1 joue également le rôle de protéine adaptatrice d'un complexe ubiquitine ligase E3. L'ubiquitinylation d'une protéine est réalisée grâce à une série de réactions catalysées par une enzyme E1 (Ubiquitin-activating enzyme), une enzyme E2 (Ubiquitin-conjugating enzyme) et une enzyme E3 (Ubiquitin ligase). L'ubiquitine ligase a deux fonctions : la première reconnaît la protéine substrat tandis que la deuxième catalyse la réaction d'ubiquitinylation. Il existe différents types de ligases E3, dans

le cas de la régulation de Nrf2, la ligase E3 est constituée d'une protéine Culline 3 formant un complexe avec une protéine Rbx1. Afin de cibler spécifiquement la protéine substrat, le complexe Cull-Rbx nécessite l'adaptateur Keap1. Keap1 lie le complexe ubiquitine ligase E3 par la liaison de son domaine BTB et une partie du domaine IVR avec la Culline 3 (Kobayashi et al., 2004 ; Li et Kong, 2009).

Par conséquent, Nrf2 n'est pas seulement séquestré par Keap1 mais également dirigé vers la dégradation protéasomale 26S en condition basale.

Un faible stress oxydatif mène à la dissociation du complexe Nrf2-Keap1. En conséquence, Nrf2 transloque dans le noyau grâce à un signal d'import nucléaire localisé dans le domaine Neh1. A l'intérieur du noyau, Nrf2 forme un hétérodimère avec des protéines nucléaires bZIP (basic Leucine ZIPper) appelées petites protéines Maf (MusculoAponeurotic Fibrosarcoma transcription factor). Ces petites protéines Maf sont composées de MafF, MafG et MafK. Ce sont des coeffecteurs essentiels dans la régulation transcriptionnelle des gènes cibles de Nrf2 puisqu'elles favorisent la liaison de Nrf2 aux séquences ARE. Ainsi, la liaison de l'hétérodimère Nrf2-Maf aux séquences ARE, localisées dans le promoteur des gènes cytoprotecteurs, favorise l'initiation de la transcription de ces gènes (Li et Kong, 2009). Une autre protéine intervient également dans l'activité transcriptionnelle de Nrf2, il s'agit du coactivateur CBP/p300. L'hétérodimère Nrf2-CBP/p300 est formé suite à l'interaction entre les domaines Neh4 et Neh5 de Nrf2 et CBP/p300 (Kato et al., 2001). Ces deux coactivateurs, les petites protéines Maf et CBP/p300, interviennent donc dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de Nrf2.

Deux modèles ont été proposés pour expliquer la disruption du dimère Nrf2-Keap1 lorsque la cellule est en présence d'un stress oxydatif : la modification des résidus cystéines de Keap1 et la phosphorylation de Keap1.

La protéine Keap1 est très riche en résidus cystéines (27 chez l'humain). Neuf de ces résidus sont ciblés par les molécules oxydantes et font de Keap1, une protéine senseur du stress oxydatif. Toutefois, la modification des résidus cystéines de Keap1 n'est pas suffisante pour provoquer la disruption du dimère Nrf2-Keap1. Seule la liaison entre le motif DLG et l'homodimère Keap1 est perturbée puisque Nrf2 est toujours lié à Keap1 via le motif ETGE. La modification des cystéines entraîne une modification de la conformation du domaine BTB de Keap1 et perturbe l'hétérodimère formé par les deux protéines Keap1. Nrf2 n'est plus affecté par l'ubiquitylation et n'est donc plus dirigé vers la dégradation protéasomale. Il semblerait que Keap1 devienne la protéine substrat pour l'ubiquitylation. Ainsi, la modification des résidus cystéines de Keap1, en présence d'un stress oxydatif, ne dissocie pas le dimère Keap1-Nrf2, Nrf2 reste associé à Keap1. Par conséquent, Nrf2 s'accumule dans le cytoplasme (figure I.15).

Cette modification des cystéines peut être un mécanisme redondant avec la phosphorylation de Nrf2 par diverses protéines kinases, les deux mécanismes peuvent également fonctionner de concert.

La phosphorylation de Nrf2 serait impliquée dans la dissociation du complexe Nrf2-Keap1. Des études ont démontré la phosphorylation directe de Nrf2 par la protéine kinase C et par la protéine ERK-1 (Extracellular signal-Regulated Kinase 1). D'autres études ont mis en évidence la phosphorylation de Nrf2 par la tyrosine kinase Fyn, un processus important pour l'export nucléaire de Nrf2. Ceci indiquerait que la phosphorylation serait une modification post-traductionnelle importante à la fois dans l'activation et la désactivation de Nrf2 (Copple et al, 2008 ; Li et Kong, 2009 ; Niture et al, 2010).

2.2.3. Gènes dont l'expression est régulée par Nrf2

Nrf2 régule un ensemble de gènes impliqués dans la défense de la cellule contre les ROS. Ainsi, ces gènes cibles encodent des enzymes de détoxification intervenant dans la métabolisation et l'élimination des espèces oxygénées réactives. Il s'agit par exemple de la NADPH : quinone oxydoréductase (NQO1), de la glutathione-S-transférase (GST), de l'hème-oxygénase (HO-1) et de la glutamate cystéine ligase (ou glutamylcystéine synthétase). Les enzymes NQO1 sont des flavoprotéines qui catalysent la réduction et la détoxification des quinones et d'autres complexes rédox. Les cellules sont ainsi protégées de la production de ROS induite par les quinones. Les enzymes GST détoxifient les xénobiotiques en conjuguant le glutathion à diverses molécules réactives, ce processus facilite leur élimination. Les enzymes HO-1 catalysent la première étape limitante dans le catabolisme de l'hème en bilirubine, monoxyde de carbone et fer. HO-1 est induite par différents stimuli dont le groupement hème, l'irradiation aux UV, les cytokines inflammatoires, le stress oxydatif. La glutamate cystéine ligase est impliquée dans la synthèse du glutathion. Le glutathion est un puissant antioxydant protégeant les cellules contre le stress oxydatif. Il est utilisé comme substrat par de nombreuses enzymes catalysant les réactions de détoxification. Le glutathion est synthétisé par l'action séquentielle de la glutamate cystéine ligase et de la glutathione synthétase.

Nrf2 régule également l'expression d'enzymes antioxydantes permettant de neutraliser les ROS telles que les thioredoxines, la glutathione peroxydase, la glutathione réductase. La glutathione réductase est impliquée dans la régénération du glutathion réduit grâce au NADPH. La glutathione peroxydase est impliquée dans la détoxification de radicaux et de peroxydes via l'utilisation du glutathion. Les thioredoxines constituent avec le glutathion, les systèmes réducteurs majeurs dans la cellule. Le système thioredoxine subit des réactions d'oxydoréduction réversibles catalysées par la thioredoxine réductase. Le système thioredoxine module l'activité de divers facteurs de transcription dont NF- κ B, AP-1 (Activator Protein-1) et HIF-1 (Alam et al., 1999 ; Chan et Kwong, 2000 ; Dhakshinamoorthy et Jaiswal, 2001 ; Kim et al., 2001 ; Thimmulappa et al., 2002 ; Niture et al, 2010).

2.3. NF- κ B

NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B) est un facteur de transcription pro-inflammatoire activé par différents signaux dont les signaux pro-inflammatoires comme il est observé dans la voie d'activation classique. D'autres stimuli peuvent également l'activer, comme par exemple, les stress chimiques ou physiques. Il peut être également activé lors d'un stress oxydatif modéré et induire par conséquent une réponse inflammatoire. En effet, un excès de ROS dans la cellule peut mener à de nombreux dommages oxydatifs au niveau des composants cellulaires et être donc responsable de l'initiation d'une réponse inflammatoire via NF- κ B. Celui-ci peut ainsi être induit en réponse à des dommages provoqués par les ROS. Les gènes cibles de NF- κ B favorisent la réponse inflammatoire, la réponse immunitaire, la survie cellulaire, la différenciation et la prolifération cellulaire. Il aurait également un rôle important dans le développement du cancer.

2.3.1. Structure

Chez les cellules mammaliennes, la famille des facteurs de transcription NF- κ B est composée de cinq protéines, p50, p52, p65 (RelA), c-Rel, RelB, encodées par les gènes *NFKB1*, *NFKB2*, *RELA*, *REL* et *RELB* respectivement. Ces cinq membres sont chacun constitués d'un domaine d'homologie Rel (RHD ; Rel Homology Domain) N-terminal, impliqué dans la liaison à

l'ADN, la dimérisation, la localisation nucléaire et l'activité inhibitrice. Seuls p65, c-Rel et RelB comportent le domaine d'activation transcriptionnelle qui permet de réguler positivement l'expression de gènes cibles (figure I.16). Ces cinq membres forment des homo- ou hétérodimères donnant des combinaisons diverses de dimères NF- κ B. Le dimère le plus étudié et le plus abondant est l'hétérodimère p50/p65 (Hayden et Ghosh, 2008).

2.3.2. Régulation

En condition basale, le dimère p50/p65 est associé à une protéine inhibitrice appelée I κ B dont 7 membres sont connus (I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3, p100 et p105). Ces protéines retiennent NF- κ B dans le cytoplasme en absence de stimulus. Elles empêchent sa translocation nucléaire en masquant la séquence de localisation nucléaire (NLS ; Nuclear Localisation Sequence) et donc sa liaison à l'ADN. L'un des membres de la famille I κ B le plus étudié est I κ B α . Toutes les protéines I κ B sont caractérisées par la présence de domaines de répétition de l'ankyrine interagissant avec le domaine RHD de NF- κ B. I κ B α ne masquerait que la séquence NLS de p65 et non celle de p50. L'exposition de la séquence NLS de p50 et de la séquence d'export nucléaire (NES ; Nuclear Export Sequence) de I κ B α aurait pour conséquence le transport continu du complexe NF- κ B/I κ B α entre le cytoplasme et le noyau. Toutefois, la localisation subcellulaire du complexe serait principalement cytoplasmique en condition basale, tandis qu'elle serait principalement nucléaire après stimulation des cellules.

La voie d'activation classique de p50/p65 est induite par différents signaux inflammatoires tels que des cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1 β), des molécules telles que le lipopolysaccharide qui activent les récepteurs TLR (Toll-Like Receptor) et les signaux activant les récepteurs TCR (T Cell Receptor). L'ensemble de ces signaux converge vers l'activation des protéines IKK (Inhibitor kappa B Kinase) par phosphorylation. Le complexe IKK contient deux sous-unités kinases (IKK α /IKK1 et IKK β /IKK2) et une sous-unité régulatrice (NEMO/IKK γ ; NF- κ B Essential MOdulator). Il phosphoryle deux résidus sérines du domaine N-terminal (ser32 et ser36) de la protéine I κ B α , ce qui induit l'ubiquitinylation de résidus lysines et sa dégradation par le protéasome 26S. Le dimère p50/p65 libéré subit diverses modifications post-traductionnelles essentielles à son processus d'activation. Il est ensuite transloqué dans le noyau grâce à sa séquence NLS où il se lie aux séquences consensus κ B dans le promoteur de gènes cibles. NF- κ B régule la transcription des gènes par le recrutement de coactivateurs et de corépresseurs. Ces gènes codent pour des cytokines, des chémokines, des molécules d'adhérence, des inhibiteurs d'apoptose (figure I.17). L'activation de cette voie classique est très importante pour la survie de cellules du système immunitaire lors d'infections bactériennes ou de stimuli inflammatoires aigus. Une voie d'activation alternative de NF- κ B existe également. Elle mène à l'activation du dimère NF- κ B p52/RelB. (Gloire et al., 2006 ; Hayden et Ghosh, 2008 ; Schmid et Birbach, 2008).

L'activité transcriptionnelle de NF- κ B est régulée par des modifications post-traductionnelles, celles-ci affectent sa capacité à interagir avec des coactivateurs transcriptionnels. Dans le cytoplasme, suite à la dégradation de I κ B α , p65 est phosphorylée par la protéine PKA (Protein Kinase A) sur le résidu sérine 276. Cette phosphorylation, très importante pour l'activité transcriptionnelle de NF- κ B, favorise l'interaction entre p65 et le coactivateur transcriptionnel CBP/p300. Les kinases IKK α et IKK β seraient également impliquées dans la phosphorylation de p65 sur le résidu sérine 536. Il a été démontré que la mutation de la sérine 536 en résidu alanine empêcherait l'interaction entre p65 et CBP/p300. Une autre kinase, PKC ζ (Protein Kinase C), peut phosphoryler p65 sur le résidu sérine 311. D'autres kinases nucléaires dont MSK1 et MSK2 (Mitogen- and Stress-activated protein Kinase) phosphorylent p65 sur le résidu sérine 276. L'ensemble de ces phosphorylations se produisent dans le domaine RHD (sérines 276 et 311) et dans le domaine TAD de p65 (sérine 536). Il est possible que ces

phosphorylations contribuent à l'activation complète de p65 en induisant des changements conformationnels qui facilitent la liaison de CBP/p300. La phosphorylation de p65 serait donc nécessaire au recrutement de CBP/p300. Dans le noyau, ce coactivateur transcriptionnel augmente l'activité transcriptionnelle de NF- κ B par acétylation du résidu lysine 310 de p65. L'acétylation de p65 ne peut être effectuée que lors du recrutement de CBP/p300 vers NF- κ B (Hayden et Ghosh, 2008).

NF- κ B peut être activé par d'autres stimuli tels que les stress chimiques et physiques. Un stress oxydatif intermédiaire peut également activer ce facteur de transcription. Ce stress oxydatif sera responsable de l'induction d'une réponse inflammatoire.

L'activation de NF- κ B par le stress oxydatif a été majoritairement étudié via l'utilisation d' H_2O_2 . Lorsque celui-ci est produit dans la mitochondrie ou par d'autres enzymes, l'anion superoxyde est très vite métabolisé en H_2O_2 , spontanément ou par la superoxyde dismutase. L' H_2O_2 exerce ses effets par lui-même ou par sa transformation en radical hydroxyl (OH \cdot). Il a été démontré que l'activation de NF- κ B par H_2O_2 est spécifique du type cellulaire et implique des mécanismes différents. L'activation de NF- κ B par l' H_2O_2 a été décrite dans les cellules T et dans les cellules épithéliales (Gloire et al., 2006).

L'activation de NF- κ B par l' H_2O_2 a été largement étudié dans les cellules T puisque celles-ci sont entre autre exposées à un stress oxydatif pendant la réponse inflammatoire, l' H_2O_2 étant produit par les neutrophiles et les macrophages. De plus, il a été montré que l'apoptose des cellules T est régulée par les ROS. Il a été démontré que l'activation de NF- κ B par l' H_2O_2 dans les cellules T suit un mécanisme différent de celui de la voie classique présentée ci-dessus (figure I.18). La phosphorylation des protéines inhibitrices I κ B a lieu sur le résidu tyrosine 42 au lieu des résidus sérines 32 et 36 dans la voie classique. Ce phénomène a été observé dans les cellules lymphocytaires T murines et les cellules T Jurkat humaines. La tyrosine kinase responsable de cette phosphorylation serait la protéine Syk (Spleen tyrosine kinase). Dans les autres cellules T, la phosphorylation classique de I κ B α par le complexe IKK a lieu sur les sérines 32 et 36. Ces cellules T Jurkat sont déficientes pour la protéine Ship-1 (SH2 domain-containing inositol-5'-phosphatase 1). Celle-ci est une phosphatase lipidique décrite comme un régulateur négatif des récepteurs du système immunitaire, des récepteurs aux facteurs de croissance et des récepteurs aux cytokines. Les cellules T Jurkat n'exprimant pas Ship-1 induisent la phosphorylation des protéines I κ B via la protéine Syk. Par contre, les autres cellules T expriment la protéine Ship-1 qui active le complexe IKK. Celui-ci phosphoryle donc les résidus sérines des protéines I κ B. La phosphorylation du résidu tyrosine de I κ B par la protéine Syk permettrait de compenser la déficience de Ship-1 dans les cellules T Jurkat.

L'activation de NF- κ B induite par l' H_2O_2 dans les cellules épithéliales a été étudiée dans les cellules HeLa. L'étude a montré un rôle important de la protéine PKD (Protein Kinase D) dans cette voie d'activation (figure I.18). L' H_2O_2 induit l'activation de la protéine Src, celle-ci est impliquée dans la phosphorylation, via la protéine Abl (Abelson murine leukemia viral), de la tyrosine 463 du domaine PH de PKD. Cette première phosphorylation favorise l'accès de la protéine PKC δ au deuxième site de phosphorylation (résidus sérine 738 et 742) de PKD. Ces deux étapes de phosphorylation permettent l'activation complète de la protéine PKD. Le complexe IKK est activé par PKD et induit la phosphorylation des résidus sérines de la protéine I κ B α . Il a été montré que cette voie de signalisation régule la survie cellulaire en réponse au stress oxydatif. Cette donnée renforce le rôle essentiel joué par NF- κ B dans la défense des cellules contre les ROS (Gloire et al., 2006).

Le mécanisme d'activation de NF- κ B a également été étudié lors de l'incubation de cellules T Jurkat et de cellules HeLa en hypoxie/réoxygénation. Dans les cellules HeLa, les cycles

d'hypoxie/réoxygénation induisent l'activation de NF- κ B via la phosphorylation de I κ B α sur la tyrosine 42 par la tyrosine kinase c-Src. Cette phosphorylation sur la tyrosine n'induit pas la dégradation de I κ B α . La protéine I κ B α phosphorylée interagirait avec la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K (PhosphoInositide 3-Kinase) et le complexe I κ B α /NF- κ B serait donc dissocié. La famille des kinases c-Src (cellular-Sarcoma) est largement reconnue pour son implication dans la régulation de gènes de réponse au stress en réponse à un stimulus tel que l'hypoxie/réoxygénation. La tyrosine kinase c-Src est activée lors du traitement des cellules HeLa par hypoxie/réoxygénation, ceci suggère qu'elle pourrait jouer le rôle de senseur rédox dans la voie d'activation de NF- κ B en hypoxie/réoxygénation. Si c-Src semble phosphoryler directement I κ B α , d'autres tyrosines kinases pourraient être également associées à c-Src dans la phosphorylation de I κ B α . Cette voie d'activation de NF- κ B est indépendante du complexe IKK et de la phosphorylation des sérines de I κ B α (Fan et al., 2003).

Le mécanisme d'activation de NF- κ B par l'hypoxie/réoxygénation est encore peu élucidé dans les cellules T jurkat. La réoxygénation de cellules T jurkat après hypoxie induit la phosphorylation de la tyrosine 42 (Imbert et al., 1996). Antonia Livosli et al. (2001) ont mis en évidence l'implication des tyrosines kinases p56^{LCK} et ZAP70 (Zeta-chain (TCR) Associated Protein kinase). Toutefois, elles n'interviennent pas dans la phosphorylation directe de I κ B α . Une autre tyrosine kinase interviendrait en aval, il s'agirait peut être de c-Src (Gloire et al., 2006). Cette phosphorylation n'induit pas la dégradation de I κ B α et n'est pas suffisante pour la dissociation du complexe I κ B α /NF- κ B dans les cellules T jurkat, comme observé dans les cellules HeLa. La sous-unité p85 de la PI3-kinase pourrait également être impliquée dans la dissociation du complexe (Livosli et al., 2001).

2.3.3. Gènes dont l'expression est régulée par NF- κ B

NF- κ B régule la transcription d'un nombre élevé de gènes, particulièrement ceux qui sont impliqués dans la réponse inflammatoire et dans la réponse immunitaire. NF- κ B est également impliqué dans la protection des cellules contre l'apoptose par l'induction de l'expression de gènes de survie.

L'activation transcriptionnelle de NF- κ B mène à l'expression de gènes codant pour des cytokines (TNF- α , IL-1 β), des chémokines, des molécules d'adhérence (ICAM-1, VCAM-1), des enzymes telles que COX-2 (CycloOXYgenase-2) produisant des médiateurs inflammatoires secondaires et des inhibiteurs d'apoptose. Ces molécules sont très importantes dans la réponse immunitaire innée et sont essentielles pour la migration des cellules phagocytaires et inflammatoires vers les tissus dans lesquels NF- κ B a été activé en réponse à une infection ou des dommages détectés (Figure I.19) (Bonizzi et Karin, 2004). Ainsi, les dommages provoqués par les ROS lors d'un stress oxydatif induisent une réponse inflammatoire via l'activation de NF- κ B.

NF- κ B joue également un rôle dans le développement du cancer puisqu'il est capable d'induire l'expression de gènes codant notamment pour des facteurs inhibiteurs de l'apoptose (cIAPs, bcl-X_L), des molécules prolifératives (IL-2, cyclines G1), des facteurs pro-angiogéniques (VEGF, IL-8), des métalloprotéinases. Ainsi, NF- κ B permettrait aux cellules malignes de résister à l'apoptose. Il interviendrait également dans la régulation de l'angiogenèse tumorale et de l'étape d'invasion des cellules tumorales dans un nouveau tissu. L'activation de NF- κ B a été reportée comme un évènement précoce dans la transformation maligne *in vitro*. D'ailleurs, il a été montré que l'inhibition de NF- κ B affaiblit le développement tumoral. NF- κ B permet de faire un lien entre le processus de l'inflammation et le cancer (Karin, 2006 ; Toffoli et Michiels, 2008).

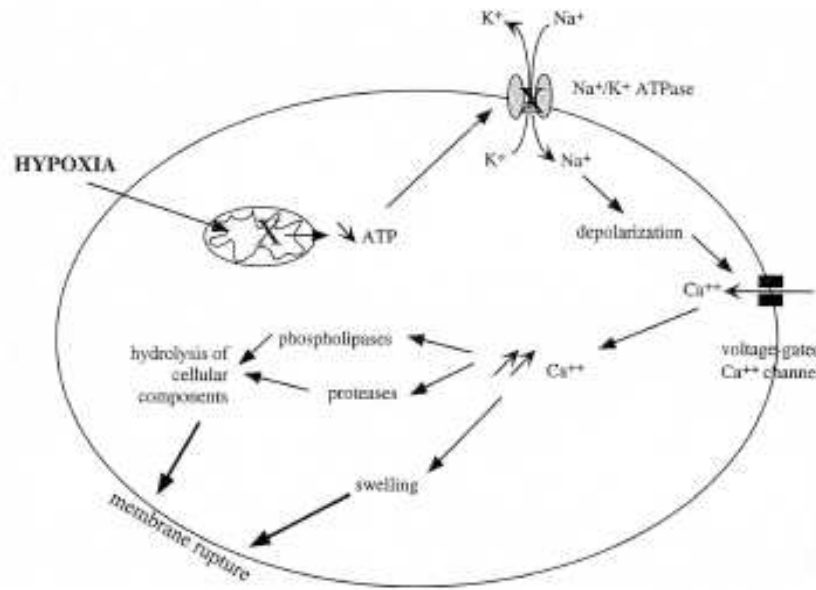


Figure I. 1 : Représentation schématique de la cascade de mécanismes menant à la mort cellulaire ou nécrose de la cellule tumorale dans un environnement hypoxique. En conditions de pression partielle faible en oxygène, l'ATP généré par la respiration mitochondriale n'est pas suffisant pour maintenir l'équilibre ionique et osmotique. Il s'en suit une cascade de mécanismes initiée par une dépolarisation de la membrane plasmique suite au dysfonctionnement de la Na⁺/K⁺ ATPase. Un influx incontrôlé d'ions calcium dans la cellule mène à l'activation de phospholipases, de protéases et à un gonflement de la cellule. Il s'en suit une hydrolyse des composants cellulaires et une rupture de la membrane plasmique (Michiels, 2004).

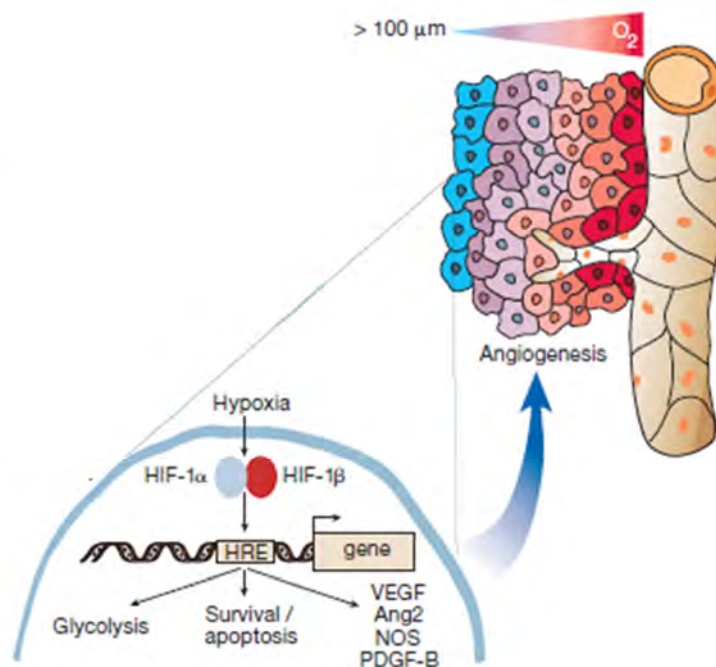


Figure I. 2 : Origine de l'hypoxie chronique dans les tumeurs. Au cours de la croissance de la masse tumorale, les cellules tumorales s'éloignent de plus en plus des vaisseaux sanguins. A une distance de plus de 100 μm, les cellules deviennent hypoxiques (le gradient allant du rouge au bleu indique une hypoxie de plus en plus prononcée). Lorsque la pression partielle en oxygène devient nulle, les cellules entrent en nécrose. L'hypoxie sélectionnera des clones capables d'induire l'angiogénèse, par l'activation du facteur de transcription HIF-1, afin de survivre dans cet environnement hypoxique (Carmeliet et Jain, 2000).

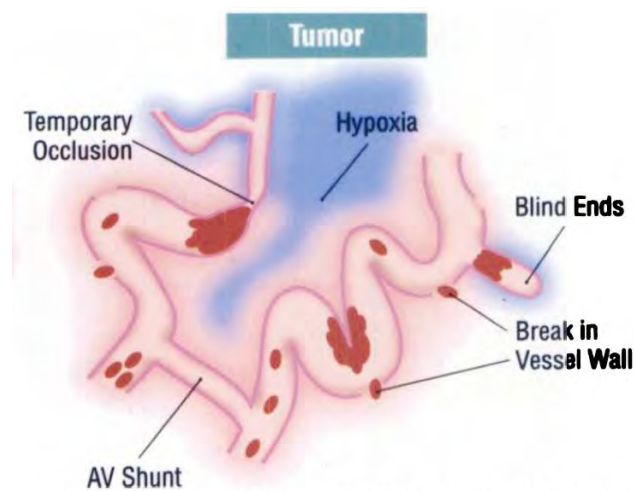


Figure I. 3 : Représentation schématique de la structure des vaisseaux sanguins au sein d'une tumeur. En plus d'être tortueux et dilatés, ces vaisseaux sanguins présentent un diamètre irrégulier. La présence d'une paroi cellulaire fragilisée et de nombreux branchements et extrémités aveugles les caractérisent également. Ces vaisseaux sanguins montrent de plus une très grande perméabilité puisqu'ils présentent une membrane basale discontinue ou absente ainsi qu'une monocouche endothéliale défectueuse (Brown et Giaccia, 1998).

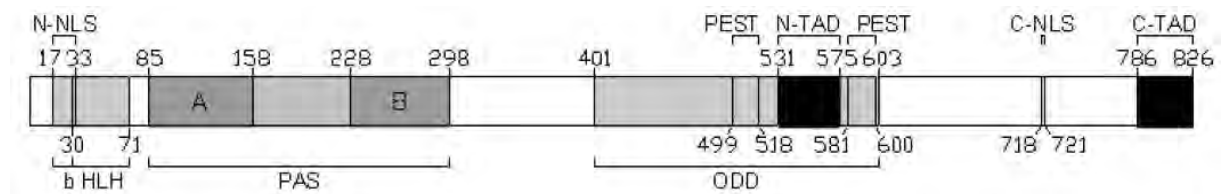


Figure I. 4: Représentation schématique de la structure de la sous-unité HIF-1 α du facteur de transcription HIF-1. HIF-1 α est une protéine de 826 acides aminés dont les principaux domaines sont : le domaine d'hétérodimérisation bHLH, le domaine PAS (les répétitions PAS-A (A) et PAS-B (B)) impliqué dans la liaison entre différents membres d'une même famille, deux domaines de transactivation du côté C-terminal (le N-TAD (N) et le C-TAD (C)) ainsi qu'un domaine ODD sensible à la variation de la pression partielle en oxygène. Les nombres indiquent les premier et dernier résidus de chaque domaine (Zagorska et al., 2004).

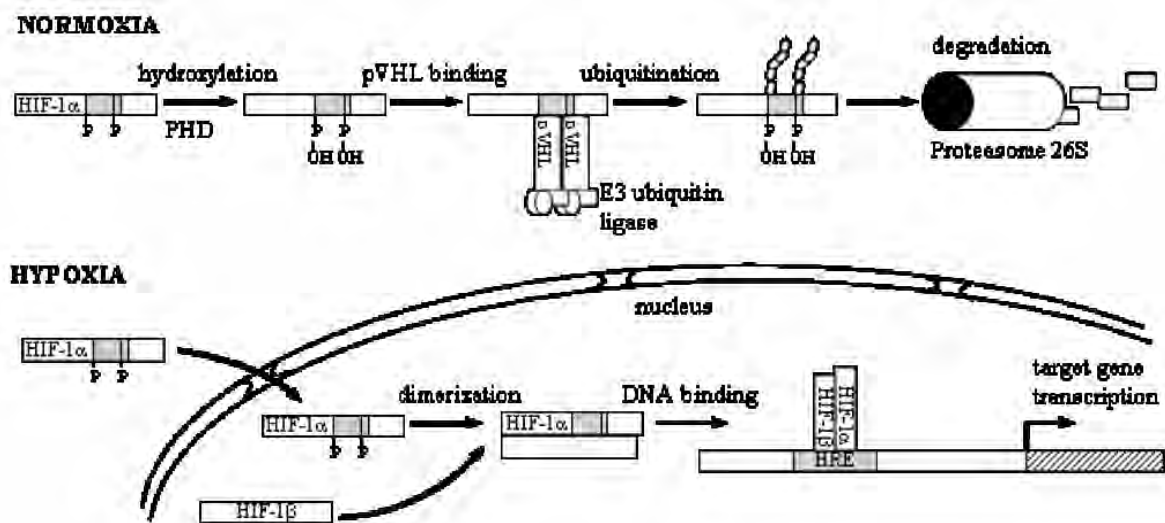


Figure I. 5 : La régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1 est dépendante de la stabilité de la sous-unité HIF-1 α en conditions de normoxie ou d'hypoxie. En normoxie, HIF-1 α est hydroxylé sur deux résidus prolines du domaine ODD par les prolyl-hydroxylases. Le domaine ODD hydroxylé est reconnu par la protéine VHL qui fait partie du complexe protéique ligase ubiquitine E3. Ce complexe est impliqué dans l'ubiquitinylation du domaine ODD. L'ubiquitinylation d'HIF-1 α induit sa dégradation par le protéasome 26S. En hypoxie, l'activité des prolyl-hydroxylases est diminuée et par conséquent HIF-1 α s'accumule dans le cytoplasme puisqu'il n'est plus ciblé pour la dégradation protéasomale. HIF-1 α est transloqué dans le noyau où il dimérise avec la sous-unité ARNT et forme le facteur de transcription HIF-1 (Zagorska et al., 2004).

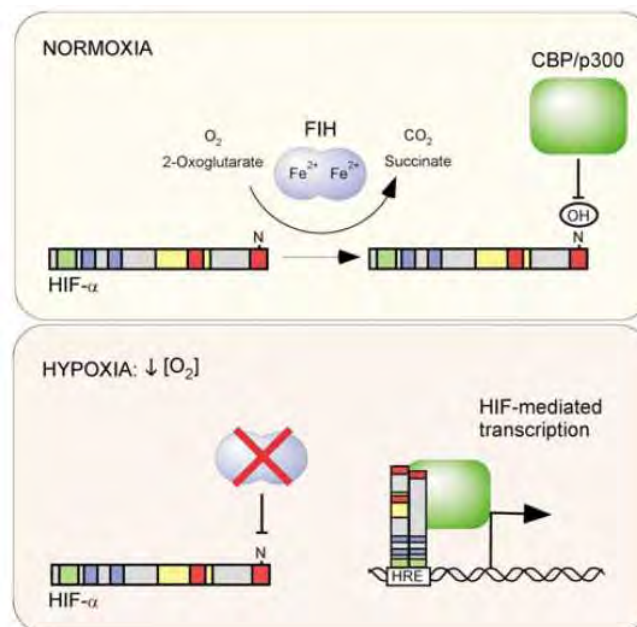


Figure I. 6 : Régulation de l'activité du domaine de transactivation C-terminal de HIF-1 α par FIH-1. En normoxie, FIH-1 hydroxyle le résidu asparagine 803 du domaine C-TAD de HIF-1 α , ce qui a pour conséquence d'empêcher toute interaction entre HIF-1 α et CBP/p300. Cette protéine est un coactivateur transcriptionnel impliqué dans la régulation de l'activité transcriptionnelle d'HIF-1 α . En hypoxie, la FIH-1 ne peut plus exercer son activité et CBP/p300 peut lier HIF-1 α . L'activité transcriptionnelle d'HIF-1 α n'est plus inhibée et les gènes cibles sont exprimés (Lisy et Peet, 2008).

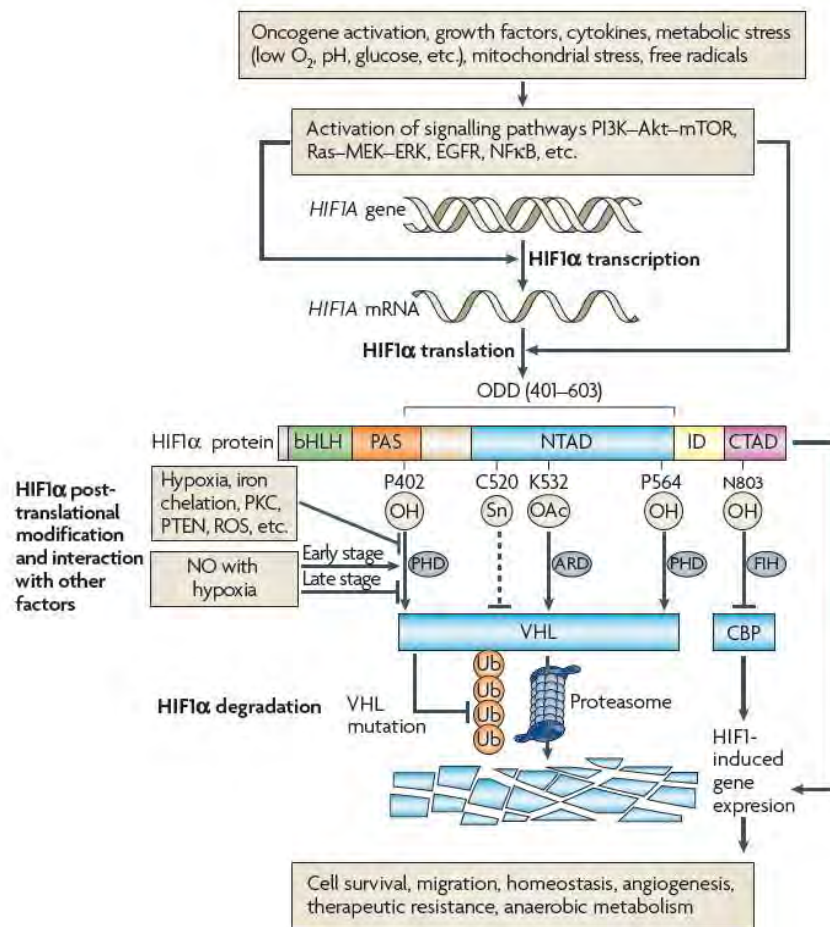


Figure I. 7 : Vue d'ensemble de la régulation du facteur de transcription HIF-1. HIF-1 est formé de deux sous-unités : HIF-1α et HIF-1β (ARNT). Son activité dépend de la stabilité de la sous-unité HIF-1α soumise à de nombreux points de régulation en absence ou en présence d'oxygène. En normoxie, la stabilité d'HIF-1α est contrôlée par les prolyl-hydroxylases qui initient sa dégradation par le protéasome 26S. En effet, ces enzymes hydroxylent le domaine ODD d'HIF-1α qui est alors reconnu par la protéine VHL (celle-ci fait partie du complexe ubiquitine ligase E3). HIF-1α est également ciblé par l'enzyme FIH qui hydroxyle un résidu asparagine du domaine C-terminal. Cette modification post-traductionnelle empêche toute interaction entre HIF-1α et le coactivateur transcriptionnel CBP/p300. En condition d'hypoxie, l'activité des prolyl-hydroxylases et de l'enzyme FIH est diminuée. HIF-1α transloque dans le noyau où il dimérise avec HIF-1β pour former le facteur HIF-1. La formation du dimère HIF-1α/HIF-1β est requise pour l'activité de HIF-1. L'activité transcriptionnelle de HIF-1 est régulée par des coactivateurs transcriptionnels tels que la protéine CBP/p300 qui interagit avec le domaine C-terminal de la sous-unité HIF-1α en hypoxie. Lorsque l'activité de transactivation de HIF-1 est complète, HIF-1 induit la transcription de gènes cibles possédant au moins un HRE dans leur promoteur. Ces gènes sont impliqués dans divers mécanismes d'adaptation de la cellule tumorale à l'hypoxie : le métabolisme anaérobie, l'angiogénèse, l'érythropoïèse,... (Dewhirst et al., 2008).

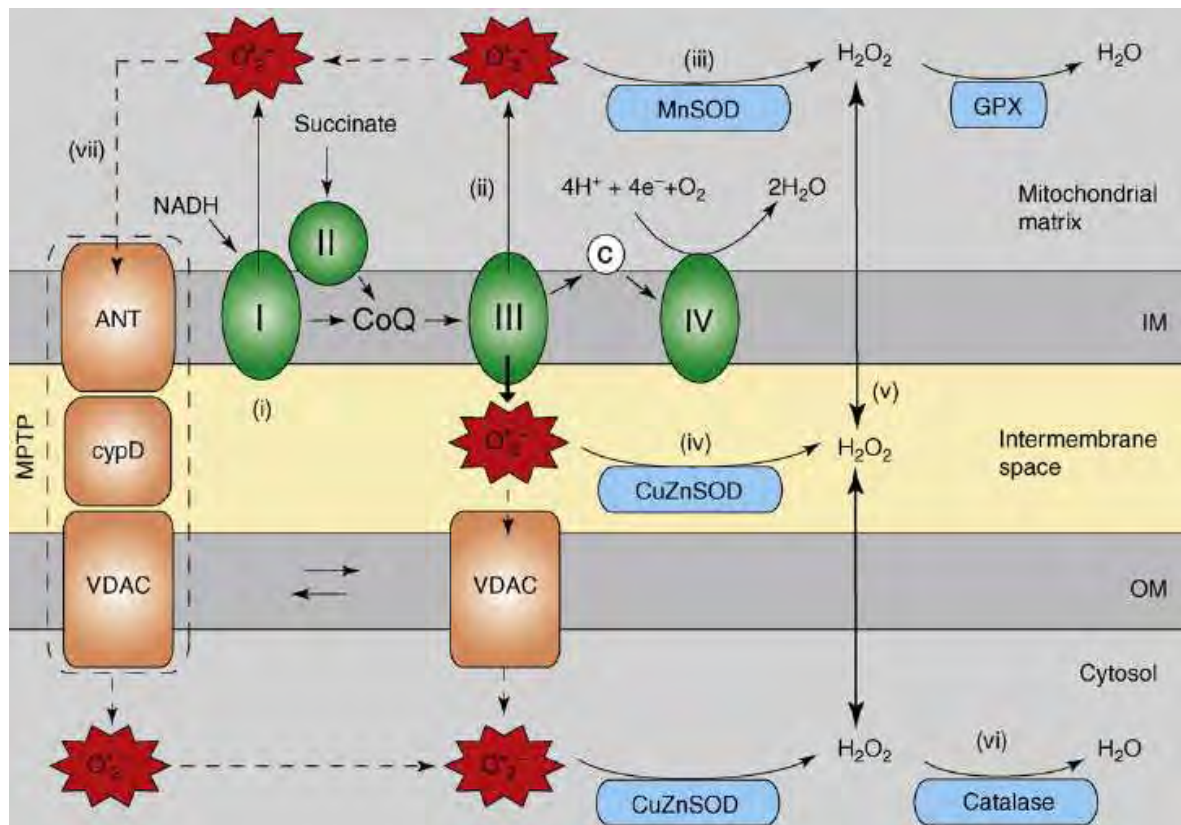


Figure I. 8 : Sites de production de ROS dans la chaîne respiratoire mitochondriale. La chaîne de transfert des électrons localisée dans la membrane interne mitochondriale est composée de 4 complexes protéiques membranaires, du coenzyme Q et d'une protéine périphérique, le cytochrome C. L'espèce oxygénée réactive principalement produite dans la mitochondrie est l'anion superoxyde. Il est majoritairement produit au niveau des complexes I et III. Les anions superoxyde générés par le complexe I sont libérés dans la matrice, tandis que ceux produits par le complexe III sont libérés à la fois dans la matrice et l'espace intermembranaire. Dans ces deux compartiments cellulaires, des superoxyde dismutases sont responsables de la métabolisation des anions superoxyde en peroxyde d'hydrogène. De plus, les anions superoxyde présents dans la matrice et l'espace intermembranaire peuvent être également transportés dans le cytosol de la mitochondrie par le canal ionique voltage dépendant (VDAC) ou le pore transitoire de perméabilité mitochondrial (MPTP) (Poyton et al., 2009).

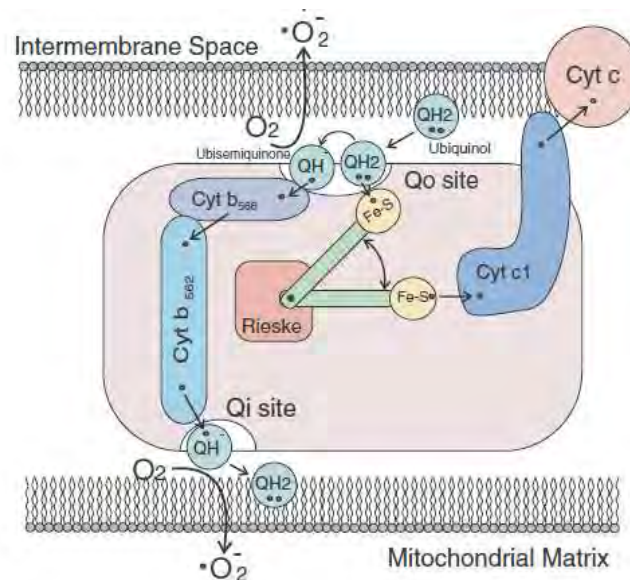


Figure I. 9 : Représentation schématique du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les anions superoxyde peuvent être générés au niveau de deux sites : le site Qo, du côté de l'espace intermembranaire et le site Qi, du côté de la matrice. L'oxygène moléculaire est capable d'accepter les électrons de l'ubisemiquinone et d'être converti en anion superoxyde (Guzy et Schumacker, 2006).

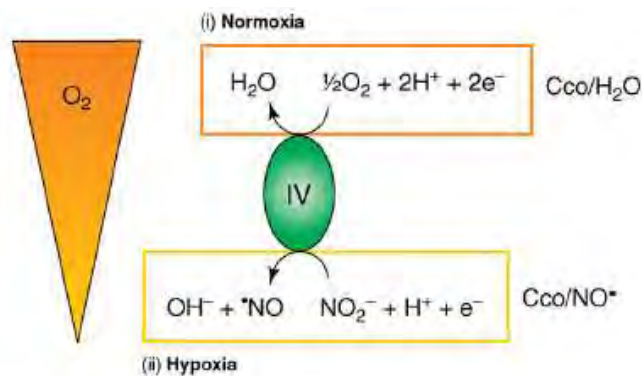


Figure I. 10 : Représentation schématique des deux types d'activité de la cytochrome c oxydase. En présence de l'oxygène, la cytochrome c oxydase catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en H_2O , c'est l'activité $\text{Cco}/\text{H}_2\text{O}$. En absence de l'oxygène, l'enzyme réduit le NO_2^- en NO^* , c'est l'activité Cco/NO^* (Poyton et al., 2009).

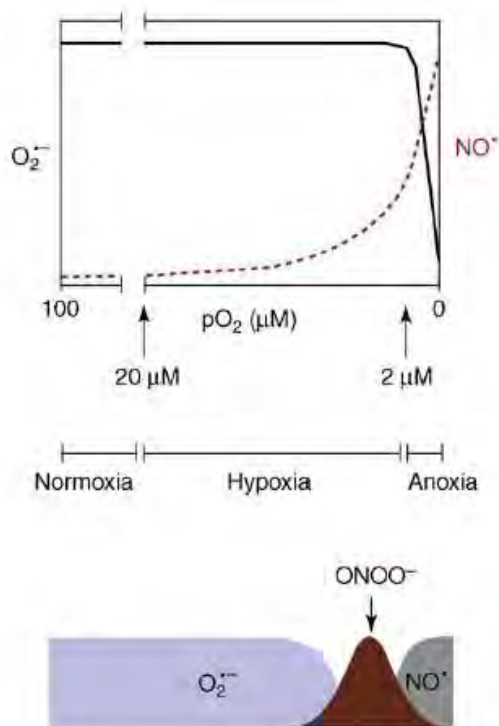


Figure I. 11 : Effets de la pression partielle en oxygène sur la nature du radical libre généré. En normoxie ($20\text{-}130\ \mu\text{M}\ \text{O}_2$), le radical majoritairement produit est l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Le peroxynitrite (ONOO^-) et l'anion superoxyde sont tous deux générés en hypoxie ($2\text{-}20\ \mu\text{M}\ \text{O}_2$). Le radical produit en anoxie (moins de $2\ \mu\text{M}\ \text{O}_2$) serait l'oxyde nitrique (NO^*) (Poyton et al., 2009).

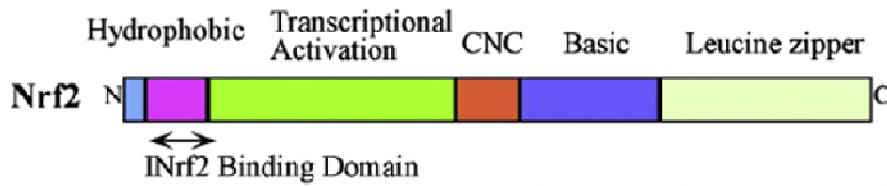


Figure I. 12 : Représentation schématique des domaines protéiques du facteur de transcription Nrf2. La protéine est constituée de 6 domaines Neh (Nrf2-ECH homology). La région cap'n'colar (CNC), la région basique et la région leucine zipper composent le domaine Neh1. Les domaines Neh4 et Neh5 contiennent les domaines de transactivation intervenant dans l'interaction avec des coactivateurs transcriptionnels tels que la protéine CBP/p300. Le domaine Neh2 est le domaine régulateur négatif localisé à l'extrémité N-terminale (Niture et al, 2010).

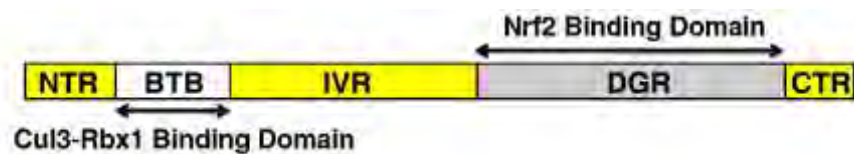


Figure I. 13 : Représentation schématique des domaines protéiques de la protéine cytosolique Keap1. La protéine est constituée de cinq domaines dont les domaines DGR et CTR qui sont impliqués dans la formation du dimère Keap1/Nrf2. Le domaine DGR intervient également dans les interactions entre Keap1 et le cytosquelette. Le domaine BTB et une partie du domaine IVR lient le complexe ubiquitine ligase E3 (Niture et al., 2010). (NTR, N-Terminal Region ; BTB, Broad complex, Tramtrack, Bric-a-brac ; IVR, Intervening/linker Region ; DGR, Kelch domain/diglycine repeats ; CTR, C-Terminal Region).

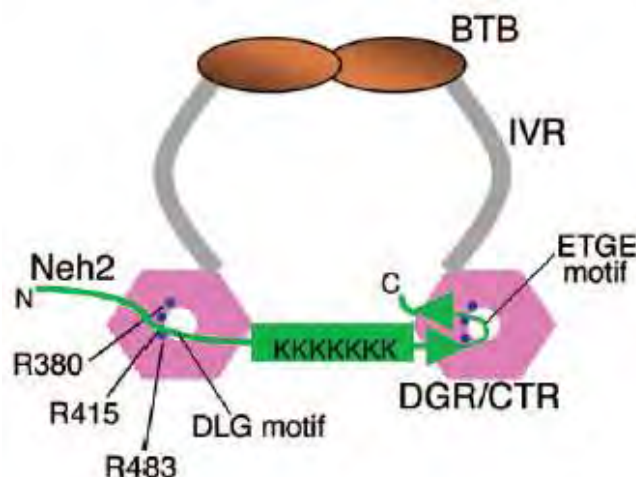


Figure I. 14 : Modèle d'interaction entre la protéine Keap1 et le facteur de transcription Nrf2. En condition basale, Keap1 séquestre Nrf2 dans le cytoplasme. Deux molécules de Keap1 s'associent à une molécule de Nrf2. Les deux protéines Keap1 s'hétérodimérisent au niveau du domaine BTB. La liaison entre Keap1 et Nrf2 s'établit grâce à l'interaction entre les domaines DGR/CTR de Keap1 et les motifs ETGE/DLG du domaine Neh2 de Nrf2. Le motif ETGE, d'affinité élevée, est essentiel pour l'interaction entre Nrf2 et Keap1, tandis que le motif DLG permet de positionner correctement les résidus lysines ciblés pour l'ubiquitylation de Nrf2 (Tong et al., 2006) .

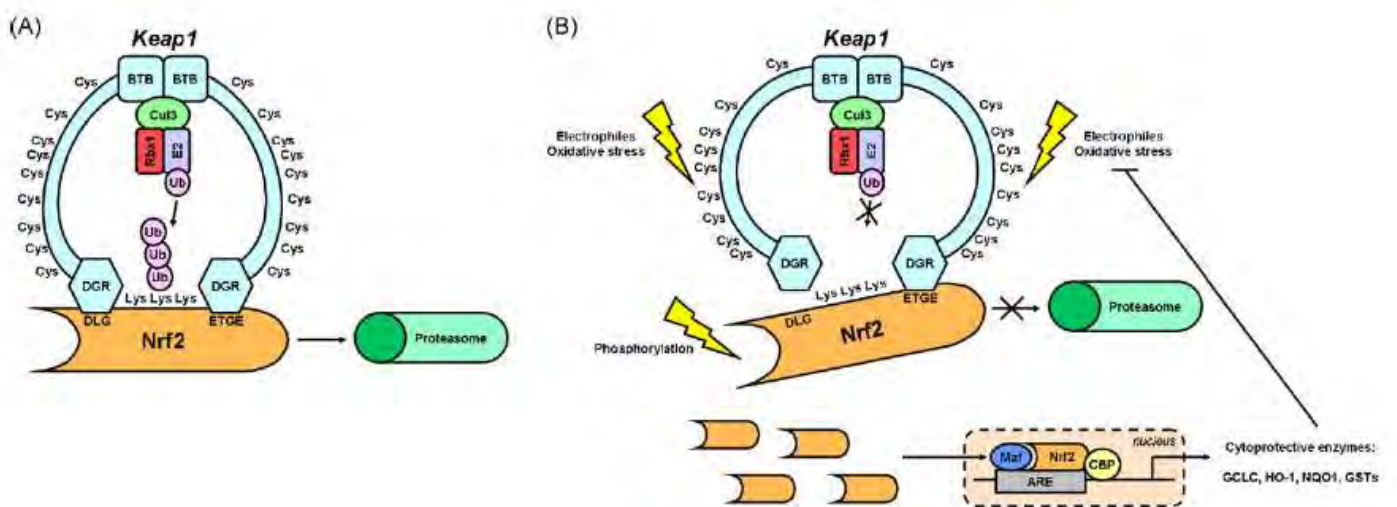


Figure I. 15 : Schéma récapitulatif de la régulation du facteur Nrf2. (A) En condition basale, Nrf2 est séquestré par Keap1 dans le cytoplasme. Deux molécules de Keap1 lient une molécule de Nrf2. La liaison s'établit entre les domaines CTR et DGR de Keap1 et les motifs ETGE et DLG de Nrf2. Le deuxième site de liaison au site DLG permet le positionnement optimal des résidus lysines Nrf2 pour l'ubiquitinylation par le complexe ubiquitine ligase E3. Nrf2 est ubiquitinylé et dirigé vers la dégradation protéasomale 26S. (B) Un stress oxydatif peut induire l'oxydation de résidus cystéines de Keap1 et modifier la conformation du domaine BTB de Keap1. De plus, la liaison entre les domaines DGR et CTR de Keap1 et le motif DLG de Nrf2 est interrompue en présence de ROS. Keap1 devient la protéine substrat du complexe ubiquitine ligase E3. Nrf2 n'est plus ubiquitinylé, ni dégradé et s'accumule donc dans le noyau où il induit l'expression de ses gènes cibles (Copple et al., 2008).

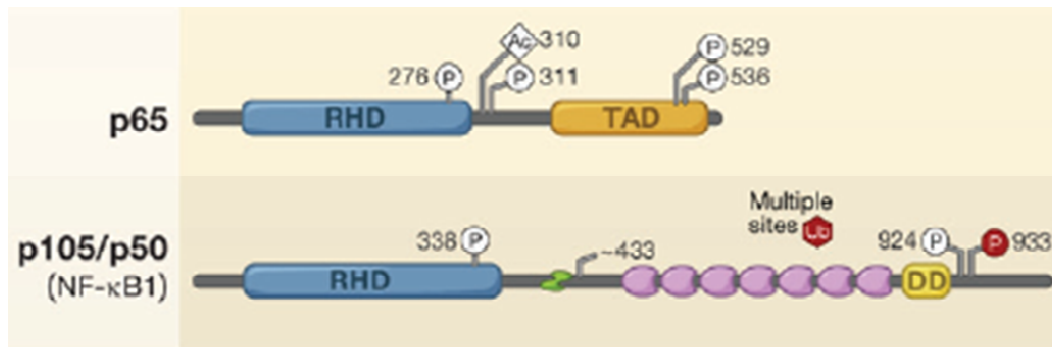


Figure I. 16 : Représentation schématique des domaines protéiques du dimère NFκB p50/p65. Le dimère le plus abondant et le plus étudié est p50/p65. Les membres de la famille NFκB sont tous constitués d'un domaine d'homologie Rel N-terminal impliqué notamment dans la liaison à l'ADN, la dimérisation, la localisation nucléaire (il contient la séquence de localisation nucléaire). La protéine p65 contient les domaines d'activité transcriptionnelle impliqués dans la régulation transcriptionnelle des gènes cibles (Hayden et Ghosh, 2008).

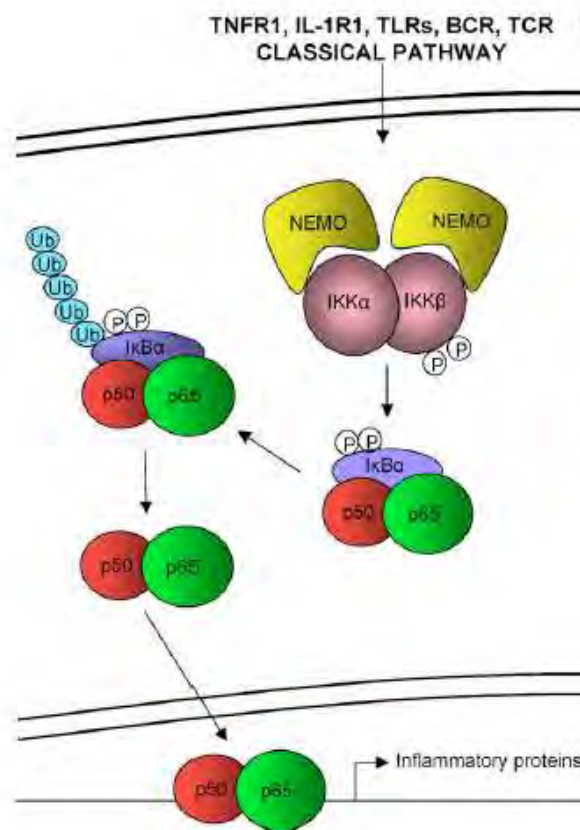


Figure I. 17 : Voie de signalisation classique de l'activation de NFκB. Des inducteurs tels que les cytokines inflammatoires provoquent l'activation par phosphorylation d'un complexe IKK composé de deux sous-unités kinases (IKKα et IKKβ) et d'une sous-unité régulatrice (NEMO). La fonction du complexe IKK est de phosphoryler deux résidus sérines situés dans le domaine N-terminal de protéines inhibitrices IκBα. Ces protéines masquent la séquence de localisation nucléaire (NLS) du dimère p50/p65 et le séquestrent donc dans le cytoplasme en condition basale. La phosphorylation de la protéine IκBα induit son ubiquitinylation et donc sa dégradation protéasomale. Le dimère p50/p65 peut alors être transloqué dans le noyau grâce à sa séquence NLS. Dans le noyau, il induit l'expression de gènes cibles dont des cytokines, des molécules d'adhérence et des inhibiteurs d'apoptose (Gloire et al., 2006).

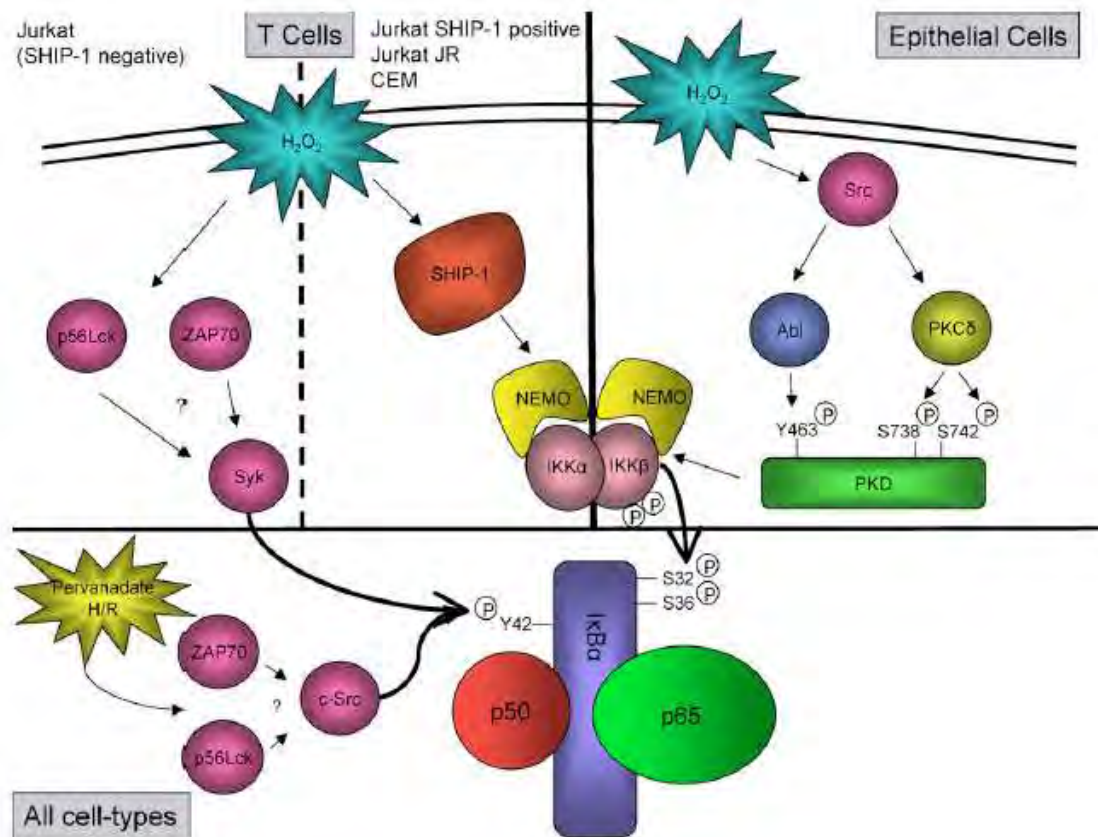


Figure I. 18 : Mécanismes d'activation de NFκB par H₂O₂ ou l'hypoxie/réoxygénation dans les cellules T et les cellules épithéliales (cellules HeLa). Dans les cellules T Jurkat, l'H₂O₂ induit la phosphorylation de IκBα sur le résidu tyrosine par la protéine Syk. Ceci plus particulièrement dans les cellules Jurkat T n'exprimant pas la protéine Ship-1. Tandis que dans les autres cellules T exprimant Ship-1, la phosphorylation a lieu classiquement sur les résidus sérines de IκBα via le complexe IKK. L'hypoxie/réoxygénation des cellules T jurkat induit également la phosphorylation de la tyrosine 42 de IκBα. Les tyrosine kinases p56Lck et ZAP70 sembleraient être impliquées dans cette phosphorylation mais de manière indirecte. Une autre tyrosine kinase pourrait intervenir en aval de ces deux kinases. Dans les cellules épithéliales, l'activation de NFκB par H₂O₂ est induite grâce à l'activation de la protéine PKD. Son activation complète est induite grâce à la phosphorylation de deux domaines de PKD. La protéine phosphoryle alors le complexe IKK qui phosphoryle à son tour la protéine IκBα. L'incubation des cellules HeLa en hypoxie/réoxygénation induit aussi la phosphorylation de la tyrosine 42 et ce, par la tyrosine kinase c-Src (Gloire et al., 2006).

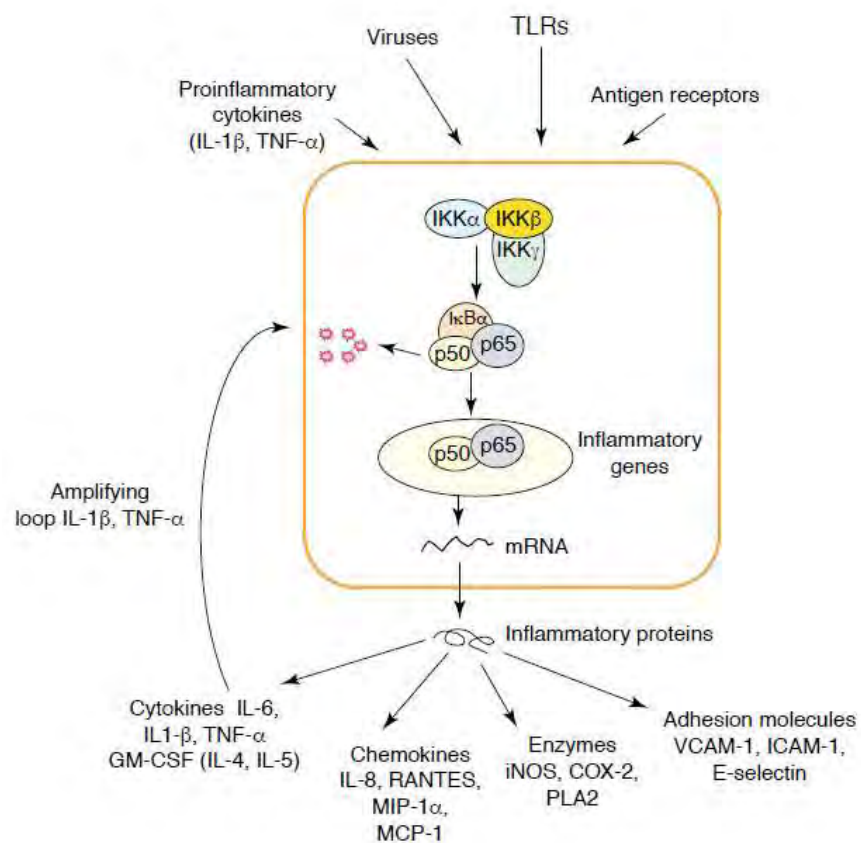


Figure I. 19: Schéma représentant quelques gènes dont l'expression est régulée par le facteur de transcription NFκB. Un stress oxydatif modéré induit l'expression de gènes codant pour des protéines inflammatoires telles que des cytokines, des molécules d'adhérence, des chémokines et la COX-2 (Bonizzi et al., 2004).

3. Objectifs

Une prolifération rapide des cellules tumorales au sein de la masse tumorale en développement est à l'origine d'une diminution de la pression partielle en oxygène dans la tumeur. En effet, plus la tumeur croît, plus la distance entre les cellules tumorales et les vaisseaux sanguins augmente. La distance de diffusion de l'oxygène devient trop élevée. Il apparaît donc des zones hypoxiques chroniques dans la tumeur. En condition d'hypoxie, la survie des cellules tumorales est favorisée grâce à l'initiation de mécanismes cellulaires d'adaptation tels que l'angiogenèse. Ce processus permet un apport en oxygène et en nutriments au sein de la tumeur afin d'assurer la survie et la prolifération des cellules tumorales dans cet environnement hypoxique. Toutefois, ces vaisseaux sanguins nouvellement formés lors du processus angiogénique sont structurellement et fonctionnellement anormaux par rapport aux vaisseaux sanguins normaux. Leurs particularités structurales et fonctionnelles sont à l'origine d'un flux sanguin irrégulier au sein de la tumeur. Ce flux irrégulier est lui-même à l'origine de l'induction de nombreuses phases d'hypoxie et de réoxygénation répétées qui caractérisent l'hypoxie intermittente.

L'hypoxie intermittente est connue pour modifier l'activité de différents facteurs de transcription dont le plus important est HIF-1. Ce facteur de transcription est essentiel à la survie, à l'adaptation et à la prolifération des cellules tumorales dans un environnement hypoxique. Par ailleurs, il a également été reconnu que des espèces oxygénées réactives sont générées pendant l'hypoxie intermittente lors des phases d'hypoxie et réoxygénation. Ces molécules réactives génèrent un stress oxydatif soit lorsqu'elles sont produites en excès dans la cellule, soit lorsque les systèmes de détoxification enzymatiques/non-enzymatiques sont déficients. Ce stress oxydatif joue un rôle important dans l'activation de facteurs de transcription régulant l'expression de gènes essentiels pour la protection et la défense des cellules contre les ROS. Deux facteurs de transcription très importants dans la réponse cellulaire contre le stress oxydatif sont Nrf2 et NF- κ B. Le premier est activé par un faible stress oxydatif et régule l'expression d'enzymes antioxydantes et d'enzymes de détoxification. D'autre part, un stress oxydatif modéré provoque une réponse inflammatoire par l'intermédiaire de l'activation de NF- κ B.

Ce mémoire étudie l'activité de ces deux facteurs de transcription, Nrf2 et NF- κ B, en condition d'hypoxie intermittente dans les cellules tumorales MDA-MB-231.

Dans un premier temps, l'objectif est d'étudier l'influence de l'hypoxie intermittente sur l'activité de Nrf2 et NF- κ B à travers l'étude de l'abondance nucléaire, de la localisation nucléaire, de l'activité de liaison à l'ADN et de l'activité transcriptionnelle de ces facteurs de transcription dans les cellules tumorales MDA-MB-231.

Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé l'influence de l'hypoxie intermittente sur l'expression des gènes cibles de ces deux facteurs de transcription dans les cellules tumorales MDA-MB-231, et ce par les techniques de RT-PCR en temps réel et d'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). L'expression de ces gènes cibles nous donnera une idée des réponses adaptatives mises en place par les cellules MDA-MB-231 confrontées au stress de l'hypoxie intermittente.

Par ailleurs, l'activation de ces facteurs de transcription et l'expression de leurs gènes cibles ont été étudiés en condition basale mais également après stimulation de Nrf2 et NF- κ B par un stimulus classique, afin de vérifier si l'hypoxie intermittente peut moduler leur activité lorsque celle-ci est augmentée dans les cellules.

II. Matériel et méthodes

1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire humaine MDA-MB-231 est une lignée de cellules épithéliales cancéreuses humaines provenant d'un adénocarcinome de glande mammaire. Ces cellules cancéreuses sont maintenues dans un milieu RPMI 1640 (1x) contenant de la L-glutamine et 10 % de sérum de veau fœtal.

1.1. Matériel

- Milieu de culture complet :
 - Milieu RPMI 1640 (1x) contenant de la L-glutamine (Gibco, UK)
 - 10 % de sérum de veau fœtal (Gibco, UK)
- PBS (Phosphate Buffer Saline) stérile (Lonza, SWZ)
- Trypsine-EDTA : solution de trypsine (0,5 g/l) et d'EDTA (0,2 g/l) préparée dans une solution de Puck (Gibco, UK)
- Tubes de 10 ml (Sterilin, UK)
- Boîtes de culture de 75 cm² (T75) ou de 25 cm² (T25) (Costar, Corning, USA)

1.2. Méthode

La culture cellulaire est maintenue par repiquages successifs. Premièrement, le milieu de culture est décanté avant de rincer deux fois les cellules avec 5 ml de PBS stérile afin d'éliminer entièrement le sérum de veau fœtal. Deuxièmement, 2 ml de trypsine-EDTA sont ajoutés dans chaque T75 après avoir décanté le PBS. Les cellules sont ensuite placées à 37°C pendant environ 30 sec. La trypsine est une protéase clivant les interactions intercellulaires et les interactions cellules-matrice extracellulaire. L'EDTA est un chélateur de cations divalents dont le calcium qui est important dans la stabilisation des interactions intercellulaires. L'action de la trypsine est arrêtée par l'ajout de 5 ml de milieu de culture complet et la suspension cellulaire est récoltée afin d'être centrifugée à 1000 rpm pendant 5 minutes. Troisièmement, le surnageant est décanté et le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu de culture complet. Le repiquage simple des cellules pour le maintien de la culture est effectué deux fois par semaine à une dilution 10x ou 15x. Par ailleurs, les cellules sont repiquées à différentes densités selon l'expérience à réaliser : 4.10⁶ de cellules par boîte T75 pour le western blot et l'analyse de l'activité de liaison des facteurs de transcription, 1.10⁶ de cellules par boîte T25 ou 4.10⁶ de cellules par boîte T75 pour la RT-PCR en temps réel, 50 000 cellules par puits dans les plaques 24 puits pour le marquage en immunofluorescence et 30 000 cellules par puits pour la transfection des systèmes rapporteurs. Finalement, les cellules sont placées dans une étuve à 37°C (5 % CO₂, 95 % air, 90 % hygrométrie).

2. Incubation sous hypoxie

2.1. Matériel (tableau II.1 et II.2)

2.2. Méthode

Avant l'incubation des cellules en conditions de normoxie ou d'hypoxie, le milieu de culture complet est remplacé par du milieu CO₂-indépendant complet : 10 ml par boîte T75 ou 1 ml

par puits pour les plaques 24 puits. En conditions d'hypoxie chronique ou d'hypoxie intermittente, les cellules sont exposées à une atmosphère contenant 99 % d'azote et 1 % d'oxygène dans un incubateur placé à 37 °C. En hypoxie intermittente, les cellules sont réoxygénées pendant 30 min après chaque heure d'hypoxie. Les cycles d'hypoxie-réoxygénation sont répétés quatre fois. En conditions de normoxie, les cellules sont maintenues dans une atmosphère normale. Afin d'étudier le facteur de transcription HIF-1, les cellules ont été incubées en normoxie, en hypoxie chronique ou en hypoxie intermittente pendant 5 h 30 min. Les facteurs de transcription Nrf2 et NF-κB ont été étudiés après 6 heures d'incubation dans ces trois conditions et en présence ou non d'un stimulateur : t-BHQ ou SIN-1 pour Nrf2 et TNF-α pour NF-κB.

3. Immunofluorescence

3.1. Principe

Le marquage en immunofluorescence est une technique qualitative permettant de déterminer la localisation subcellulaire et l'abondance de protéines d'intérêt grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques. Cette technique est ainsi basée sur l'utilisation de deux types d'anticorps : l'anticorps primaire est spécifique de la protéine d'intérêt tandis que l'anticorps secondaire cible l'anticorps primaire. Cet anticorps secondaire est couplé à un fluorochrome excitable à une longueur d'onde spécifique. Le fluorochrome a la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse et de la réémettre partiellement sous forme de photons, de façon à reconstituer une image lors de l'observation au microscope confocal.

3.2. Matériel (tableau II.3)

3.3. Méthode

Le marquage en immunofluorescence est réalisé sur des cellules MDA-MB-231 ensemencées à une densité de 50 000 cellules/puits par plaque 24 puits sur des lamelles couvre-objets stérilisées. L'incubation en normoxie, en hypoxie chronique ou en hypoxie intermittente est effectuée le lendemain durant 6 h. A la fin de ces incubations, les puits sont décantés et les cellules sont fixées pendant 10 min avec 500 µl/puits de PBS-paraformaldéhyde 4 %. Ensuite, les puits sont rincés trois fois au PBS avant d'ajouter 500 µl/puits de PBS-Triton X-100 1 % afin de perméabiliser les cellules et ce, pendant 5 min. La perméabilisation est nécessaire pour favoriser la pénétration des anticorps primaires et secondaires couplés à un fluorochrome dans les cellules. Une fois le temps d'incubation terminé, les cellules sont rincées 3 fois au PBS-BSA 2 % pendant 10 min.

Par la suite, une chambre humide d'incubation, dans laquelle est déposé un parafilm par-dessus un papier Whatman humidifié, est préparée. Une goutte de 30 µl d'anticorps primaire (tableau II.4) dilué dans du PBS-BSA 2 % est déposée sur le parafilm. Les lamelles couvre-objets sont retournées sur les gouttes d'anticorps primaire. Les lamelles couvre-objets sont incubées en chambre humide pendant 2 heures à RT ou overnight à 4 °C. Lorsque l'incubation est terminée, les lamelles sont replacées dans les puits et sont rincées 3 x au PBS-BSA 2 %. Les lamelles couvre-objets sont ensuite incubées avec 30 µl d'anticorps secondaire (tableau II.4) dilué dans du PBS-BSA 2 % pendant 1 h à RT dans l'obscurité pour préserver les propriétés du fluorochrome.

Après ce temps d'incubation, les cellules sont rincées 3 x au PBS-BSA 2 % avant d'effectuer le marquage nucléaire comme contrôle : les lamelles couvre-objets sont mises en présence de 30 µl de Topro-3 (10 µl de Topro dilué 80 x dans 2 mg/ml de RNase) durant 35 min à RT dans l'obscurité. Le Topro-3 permet la visualisation des cellules. Enfin, les cellules sont rincées 3 x au PBS avant d'effectuer le montage des lamelles couvre-objets sur les lames porte-objets. Une goutte de Mowiol, préchauffé à 57 °C, est déposée sur une lame dégraissée à l'alcool avant d'y retourner la lamelle. Les lames sont conservées à 4 °C avant leur observation au microscope confocal.

4. Western blot

4.1. Principe

Le western blot permet de détecter la présence d'une protéine d'intérêt dans un extrait cellulaire et ce, pour différentes conditions testées. Cette technique consiste à séparer un échantillon protéique par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate (SDS), un détergent dénaturant. Cet agent dénaturant confère à la protéine une charge globale négative. La migration des protéines s'effectue grâce à l'application d'un champ électrique et leur séparation sera fonction uniquement de leur taille. A la fin de la migration, les protéines sont transférées transversalement depuis le gel de polyacrylamide sur une membrane grâce à l'application d'un champ électrique. Les protéines s'adsorbent sur la membrane de transfert. La membrane est ensuite incubée en présence d'un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt. Afin de révéler la présence de l'anticorps primaire sur la membrane, un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome et reconnaissant le fragment Fc de l'anticorps primaire est utilisé. La membrane est séchée avant d'être révélée grâce à l'appareil Li-cor Odyssey. Cet appareil permet de détecter la présence de l'anticorps secondaire et donc de la protéine d'intérêt dans les longueurs d'onde de l'infra-rouge.

4.2. Extraction nucléaire

4.2.1. Matériel (tableau II.5)

4.2.2. Méthode

Les extraits nucléaires sont préparés à partir de cellules MDA-MB-231 incubées en normoxie, en hypoxie chronique ou en hypoxie intermittente durant 5 h 30 min pour le facteur de transcription HIF-1. D'autres extraits sont également réalisés à partir des cellules stimulées ou non par le t-BHQ ou le TNF- α afin d'étudier les protéines Nrf2 et NF- κ B respectivement et incubées en normoxie ou en hypoxie pendant 6 h. Lorsque les incubations sont terminées, l'extraction nucléaire est effectuée sur glace. Les cellules MDA-MB-231 sont tout d'abord rincées une fois dans 10 ml de PBS avant d'être rincées une fois dans 10 ml de PBS contenant du NaF 5 mM et du Na₂MoO₄ 1 mM. Les cellules sont ensuite incubées avec 10 ml de tampon hypotonique pendant 5 min afin de fragiliser la membrane cellulaire. A la fin de ce temps d'incubation, le tampon hypotonique est décanté et 500 µl de tampon de lyse est ajouté. Les cellules sont raclées et la suspension cellulaire obtenue est récoltée dans un eppendorf pour la centrifugation à 13 000 rpm pendant 30 s. Après centrifugation, le culot est resuspendu dans 50 µl de RE complet et par la suite 50 µl de SA complet sont ajoutés. Les échantillons sont ensuite placés sur roue pendant 30 min minimum à 4 °C avant d'être centrifugés 10 min à 13 000 rpm et à 4°C. Le surnageant contenant les protéines nucléaires est récolté, aliquoté et conservé à -70 °C. Ces aliquots seront utilisés pour le western blot ainsi que pour l'étude de

l'activité de liaison de protéines nucléaires. D'autres aliquots sont réalisés pour le dosage de la concentration en protéines par la méthode de Bradford ou la méthode Pierce.

4.3. Dosage de la concentration en protéines par la méthode de Bradford

4.3.1. Matériel (voir tableau II.6)

4.3.2. Méthode

Cette méthode permet de déterminer la concentration totale en protéines dans un échantillon par dosage colorimétrique. En effet, ce dosage se base sur le changement de coloration du bleu de Coomassie G-250 en fonction de la concentration en protéines dans l'échantillon à analyser. Le bleu de Coomassie se lie aux acides aminés basiques (surtout l'arginine) mais aussi aux acides aminés aromatiques. Le complexe coloré formé présente un maximum d'absorption à 595 nm. Afin de réaliser le dosage, le colorant Bradford est dilué 5x. Pour chaque échantillon, 1 ml de colorant Bradford est placé dans un tube à Bradford. Il en va de même pour la BSA utilisée comme étalon, de l'eau distillée servant de blanc pour l'étalon et du tampon de lyse servant de blanc pour les échantillons. Ces trois contrôles permettront par la suite la normalisation des valeurs d'absorbance obtenues. 2,5 µl d'extraits protéiques ou de contrôles sont ajoutés à ce 1 ml de colorant Bradford toutes les 30 sec. Une mesure de la densité optique est réalisée 5 min après l'ajout du premier extrait, à une longueur d'onde de 595 nm au spectrophotomètre. Une fois les valeurs d'absorbance obtenues, il est possible de déterminer la concentration en protéines des différents extraits selon la formule suivante :

$$\mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{\text{moyenne DO échantillon} - \text{moyenne DO blanc échantillon}}{\text{moyenne DO étalon} - \text{moyenne DO blanc étalon}} \times \frac{5 \mu\text{g}}{2,5 \mu\text{l}}$$

4.4. Dosage de la concentration en protéines par la méthode de Pierce

4.4.1. Matériel (tableau II.7)

4.4.2. Méthode

Contrairement au dosage par la méthode de Bradford, la méthode de Pierce est basée sur la liaison d'une sonde métallique à des protéines en conditions acides provoquant une modification du spectre d'absorption de la sonde. Ce shift est mesuré à une longueur d'onde de 660 nm grâce au spectrophotomètre. La liaison du réactif Pierce aux protéines induit un changement de coloration du réactif par déprotonation de la sonde à un faible pH suite aux interactions de celle-ci avec les acides aminés chargés positivement des protéines. Le réactif Pierce interagit ainsi principalement avec les acides aminés basiques. Cette méthode est compatible avec de nombreux détergents et agents réducteurs. Une gamme étalon de la BSA à différentes concentrations (0 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 10) est établie afin de réaliser par après une courbe d'étalonnage de la BSA. Pour chaque échantillon, 1 µl d'extrait protéique et 9 µl d'eau sont disposés dans les puits d'une plaque 96 puits Elisa. Un blanc avec de l'eau ainsi qu'un blanc avec le tampon de lyse sont réalisés. Les dosages sont réalisés en duplicat. Par la suite, 150 µl du réactif Pierce est ajouté dans chaque puits. La lecture est réalisée au spectrophotomètre à 660 nm 5 min après l'ajout du réactif.

4.5. Western blot

4.5.1. Matériel (tableau II.8 et II.9)

4.5.2. Méthode

4.5.2.1. *Electrophorèse*

Une fois le montage des plaques effectué, le gel séparateur est préparé en fonction du pourcentage d'acrylamide désiré et coulé entre les deux plaques. Ensuite, 1 ml d'isobutanol est déposé en surface du gel afin d'éviter tout contact avec l'oxygène et de favoriser la polymérisation. Lorsque le temps de polymérisation est écoulé (1h), l'isobutanol est éliminé et le montage est rincé abondamment à l'eau. Le montage est ensuite séché à l'aide d'un papier Whatman. Le gel séparateur, qui a été préparé pendant la polymérisation du gel séparateur, est coulé entre les deux plaques jusqu'au bord supérieur des plaques. Le peigne est directement inséré entre les deux plaques après coulage du gel. Le gel concentrateur doit polymériser pendant 45 min.

Pendant ce laps de temps, les échantillons à charger sont préparés. Dans un eppendorf, un volume d'échantillon correspondant à environ 15 à 20 µg de protéines est ajouté à 5 µl de bleu de charge. Le volume final de tous les échantillons est porté à 25 µl avec de l'eau distillée. Par la suite, les échantillons sont disposés sur un bloc chauffant à 100 °C pendant 4 min afin de dénaturer les protéines et par après centrifugés pendant 2 min à 13 000 rpm.

Au terme de la polymérisation, le gel, dans son support de plaques, est disposé au sein d'une cuve et du running buffer est ajouté dans le compartiment intérieur du support de plaques au-delà de la limite de la plus petite plaque. Le peigne est retiré doucement et les échantillons ainsi que l'étalon de poids moléculaire sont chargés dans les puits appropriés. Le volume restant de running buffer est ajouté dans la cuve. Finalement, la cuve est reliée au générateur, celui-ci étant réglé sur 200 V, 160 mA, 15 watt/gel pendant 1 h 20 min.

4.5.2.2. *Transfert*

Lorsque la migration des échantillons se termine, quatre papiers Whatman ainsi qu'une membrane de la grandeur du gel sont découpés. La membrane est réhydratée dans du méthanol 100 % pendant 1 min avec le papier Whatman avant d'être équilibrée dans du blotting buffer pendant 5 min. Simultanément, la migration des échantillons protéiques est arrêtée et le gel démoulé. Une éponge est placée sur l'appareil de transfert et par-dessus, 2 papiers Whatman. Après élimination du gel concentrateur, la membrane est déposée sur le gel. L'ensemble est retourné et déposé sur l'appareil de transfert. 2 papiers Whatman sont disposés sur le gel et par la suite une deuxième éponge. Enfin, l'appareil de transfert est réglé sur 150 mA pendant 2 h ou 30 mA toute la nuit.

4.5.2.3. *Traitement de la membrane et révélation*

A la fin du transfert des protéines du gel vers la membrane, celle-ci est bloquée dans 10 ml de PBS-Odyssey Blocking Buffer (dilué 2x) pendant 1h à RT ou une nuit à 4 °C. L'agent bloquant Licor est un agent bloquant se liant sur les sites de fixation aspécifiques de l'anticorps sur la membrane. Il permet donc une meilleure spécificité de l'anticorps utilisé. Ensuite, la membrane est incubée en présence de l'anticorps primaire (tableau II.10) dilué dans 10 ml d'agent bloquant Licor-Tween 0,1 % pendant 2 h à RT ou une nuit à 4 °C. Par après la membrane est rincée 4 x 5 min au PBS-Tween 0,1 %. Chacune des prochaines étapes

se fait à présent à l'obscurité puisque la membrane est incubée en présence de l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (tableau II.10) dilué dans 10 ml d'agent bloquant Licor-Tween 0,1 % et ce pendant 1 h à RT. Par la suite, la membrane est de nouveau rincée 4 x 5 min au PBS-Tween 0,1 % et ensuite 2 x 5 min au PBS afin d'éliminer toute trace de Tween. En effet, celui-ci peut interférer avec le signal de fluorescence réémis par le fluorochrome. Lorsque la membrane est rincée, elle est placée entre deux papiers Whatman toujours à l'obscurité à 37 °C pendant 1 h avant sa révélation. Une fois la membrane séchée, celle-ci est scannée grâce à l'appareil appelé Odyssey Licor. Le même processus est réalisé pour le contrôle de charge.

5. Etude de l'activité de liaison à l'ADN de facteurs de transcription (Trans-AM)

5.1. Principe

Le Trans-AM permet de quantifier la liaison d'un facteur de transcription à sa séquence consensus sur l'ADN. Cette méthode utilise des plaques 96 puits dont les puits sont coatés avec des oligonucléotides trappeurs contenant la séquence consensus spécifiquement reconnue par le facteur de transcription d'intérêt. La liaison du facteur de transcription à sa séquence consensus est détectée grâce à un anticorps primaire reconnu à son tour par un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. Les puits incubés avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase sont mis en présence d'une solution TMB (tétraméthylbenzidine), le TMB étant le substrat de la peroxydase. Il se produit un changement de coloration de la solution TMB. L'absorbance du produit de la réaction est lue au spectrophotomètre à 405 nm ou à 450 nm.

5.2. Extraction nucléaire

Les extraits nucléaires sont obtenus selon la méthode décrite au point 4.2. du protocole du western blot.

5.3. Dosage de la concentration en protéines par la méthode de Bradford

La concentration totale en protéines est déterminée selon la méthode décrite au point 4.3. du protocole du western blot.

5.4. Dosage de la concentration en protéines par la méthode de Pierce

La concentration totale en protéines est déterminée selon la méthode décrite au point 4.4. du protocole du western blot.

5.5. Dosage de l'activité de liaison du facteur de transcription étudié à l'ADN

5.5.1. Matériel (tableau II.11 et II.12)

5.5.2. Méthode

Une fois le tampon de binding et le tampon de lyse préparés, il faut préparer les échantillons. Pour chaque condition, il faut diluer 10 µg de protéines dans 20 µl de tampon de lyse. Chacune des conditions est testée en double. Ensuite, 30 µl de tampon de binding complet ainsi que 20 µl d'extraits protéiques dilués dans le tampon de lyse sont déposés dans chaque puits coaté. Des contrôles négatifs sont aussi réalisés (l'extrait protéique est remplacé par le tampon de lyse). La plaque 96 puits est incubée 1 h à température ambiante sur agitateur. Après ce temps d'incubation, les puits sont rincés trois fois avec 200 µl/puits de PBS 50 +

Tween 0,1 %. A la fin de ces rinçages, les puits sont incubés avec 100 µl d'anticorps primaire dilué dans du PBS 50 + gloria 1 %, et dirigé contre le facteur de transcription étudié, pendant 1 h à température ambiante. Lorsque l'incubation est terminée, les puits sont de nouveau rincés trois fois avec 200 µl/puits de PBS 50 + Tween 0,1 % avant d'ajouter 100 µl d'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et dilué dans du PBS 50 + gloria 1 % pendant 1 h à température ambiante.

Enfin, les puits sont de nouveau rincés quatre fois au PBS 50 + Tween 0,1 % avant d'ajouter 100 µl/puits de solution TMB. La plaque 96 puits est incubée 10 min à l'obscurité. La réaction est arrêtée grâce à l'ajout de 100 µl/puits de solution HCl. Une mesure de la densité optique est effectuée à 450 nm avec la référence 655 nm pour Nrf2 et à 405 nm avec la référence 655 nm pour NF-κB à l'aide du spectrophotomètre.

6. Etude de l'activité transcriptionnelle par système rapporteur

6.1. Principe

Un système rapporteur a la propriété de déterminer l'activité transcriptionnelle d'un facteur de transcription dans différentes conditions étudiées. En effet, son activité sera détectée grâce à l'induction de l'expression d'un gène rapporteur codant pour la luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur reconnu par le facteur de transcription d'intérêt.

La luciférase est une enzyme catalysant, en présence d'ATP et de magnésium, l'oxydation de la luciférine en oxyluciférine. L'oxydation de la luciférine produit de la lumière qui est mesurée grâce à un luminomètre. Cette émission de lumière est proportionnelle au taux de transcription du gène codant pour la luciférase, et donc par conséquent à l'activité du facteur de transcription d'intérêt.

Le plasmide rapporteur est cotransfecté avec un plasmide de normalisation : un plasmide contenant un gène codant pour la luciférase de Rénilla (plasmide pRL-SV40). L'expression de la luciférase de la méduse Rénilla est sous le contrôle d'un promoteur fort et constitutif. Ce plasmide permet de normaliser les valeurs obtenues en fonction de l'efficacité de la transfection et de déterminer le rendement de la transfection. L'agent de transfection utilisé afin de permettre l'introduction de ces plasmides à l'intérieur des cellules est la lipofectamine.

6.2. Matériel (tableau II.13 et II.14)

6.3. Méthode

La veille de la transfection, les cellules sont repiquées à une densité de 20 000 cellules/puits dans des plaques 24 puits. Elles sont transfectées le lendemain soir et ce pendant toute la nuit. L'ADN et la lipofectamine sont tout d'abord incubés séparément avec l'opti-MEM sans sérum, à savoir 100 µl d'opti-MEM pour 1 µg d'ADN et 100 µl d'opti-MEM pour 2 µl de lipofectamine respectivement. La lipofectamine est utilisée dans ce cas-ci parce qu'il est un des agents transfectants le moins toxique pour les cellules. 1 µg d'ADN est ajouté par puits. Il contient 12/13 de plasmide rapporteur et 1/13 de plasmide de normalisation Renilla. Une fois le mélange réalisé séparément, il faut laisser incuber pendant 5 min. Lorsque le temps d'incubation est écoulé, le mélange lipofectamine et opti-MEM est ajouté au mélange ADN et opti-MEM et laissé incuber pendant 20 min. Pendant ce temps d'incubation, le milieu des puits est décanté et les cellules sont rincées une fois avec 1 ml de PBS. Les puits sont de

nouveau décantés avant d'ajouter 200 µl/puits du mélange ADN/agent transfectant. Les cellules sont incubées toute la nuit dans une étuve à 37°C (5 % CO₂, 95 % air, 90 % hygrométrie). Le lendemain, la transfection des cellules est arrêtée par l'ajout de milieu CO₂-indépendant. Les cellules sont ensuite incubées en normoxie, hypoxie chronique ou hypoxie intermittente pendant 6 h. A la fin de l'incubation, le milieu CO₂-indépendant complet est renouvelé et les cellules sont placées à 37 °C jusqu'au lendemain (c'est le temps qu'il faut pour que la protéine Renilla soit traduite). Afin de réaliser la révélation de la transfection, les puits sont décantés et rincés au PBS. Ensuite, les cellules sont lysées suite à l'ajout de 100 µl/puits de Passive Lysis Buffer. Les cellules sont incubées en présence de ce tampon 15 min sur agitateur. Après agitation, les cellules sont splashées et la suspension cellulaire est récoltée dans un eppendorf. Après une centrifugation de 3 min à 13 000 rpm, les surnageants obtenus sont récoltés dans un nouvel eppendorf. Par la suite, 60 µl de LARII sont disposées dans chaque cuvette avant de réaliser la lecture au luminomètre pour suivre l'activité de la luciférase firefly. 20 µl de lysat cellulaire sont ajoutés au LARII et une première mesure est effectuée après agitation. 60 µl de solution Stop and Glo sont ajoutés directement et une deuxième lecture est réalisée pour mesurer l'activité de la luciférase Renilla. Les deux lectures doivent être réalisées en 30 secondes maximum. Les résultats sont exprimés en fonction du rapport de l'activité de la luciférase firefly sur l'activité de la luciférase Renilla.

7. Etude de l'expression de gènes cibles par RT-PCR en temps réel

7.1. Principe

Cette technique est une PCR permettant d'évaluer le niveau d'expression d'un gène d'intérêt dans différentes conditions étudiées. Cette technique quantitative utilise le Sybr Green, un agent intercalant ne se liant qu'à l'ADN double brin et induisant dans ces conditions l'émission de fluorescence. C'est cette émission de fluorescence qui permettra de mesurer la quantité d'ADNc double brin produite pendant la réaction. La quantification est basée sur la notion de cycle seuil ou cycle threshold (Ct). Le cycle seuil se définit comme le cycle PCR à partir duquel le signal de fluorescence émis se distingue du bruit de fond. Le Ct est inversement proportionnel à la quantité d'ADN initial. Plus il est faible, plus il y avait d'ADNc au départ.

7.2. Extraction d'ARN total

7.2.1. Matériel (tableau II.15)

7.2.2. Méthode

L'extraction d'ARN total doit être réalisée obligatoirement en conditions « RNase free » afin d'empêcher toute dégradation de l'ARN manipulé. C'est pourquoi le matériel utilisé et la paillasse sont nettoyés au SDS 1 % avant toute manipulation. Après incubation des cellules en normoxie, hypoxie chronique ou hypoxie intermittente durant 6h, les cellules sont décantées sur glace avant d'ajouter 1 ml (T75) ou 300 µl (T25) de TRI Reagent Solution. Le lysat cellulaire obtenu est ensuite récolté dans un eppendorf et incubé 5 min à RT pour être ensuite conservé toute une nuit à – 70 °C. Le lendemain, 200 µl (T75) ou 65 µl (T25) de chloroforme RNase free sont ajoutés aux échantillons. Ceux-ci sont ensuite vortexés et incubés 5 à 15 min à température ambiante. Après ce temps d'incubation, les échantillons sont centrifugés à 12 000 g à 4 °C pendant 10 min. La centrifugation permet de séparer les échantillons en trois phases : une phase supérieure contenant l'ARN d'intérêt, une phase intermédiaire blanche

composée des protéines et une phase inférieure constituée de la phase organique contenant les acides nucléiques et les molécules lipidiques. La phase supérieure contenant l'ARN est récoltée dans un nouvel eppendorf après centrifugation. Un volume d'isopropanol égal au volume de la phase supérieure récupérée est également ajouté. Par la suite, les échantillons sont incubés 10 min à température ambiante avant la centrifugation à 12 000 g à 4 °C pendant 10 min. Ensuite, le surnageant est décanté et 1 ml d'éthanol 75 % est ajouté afin de purifier le culot. Les échantillons sont de nouveau centrifugés pendant 5 min à 7600 g à 4 °C. Une fois cette étape terminée, le surnageant est décanté prudemment et le culot d'ARN est séché sur un bloc chauffant à 37 °C pendant 5 min. Enfin, le culot d'ARN est resuspendu dans 100 µl (T75) ou 30 µl (T25) d'eau RNase free et placé pendant 10 min à 55 °C afin de favoriser sa resuspension.

Par la suite, un dosage de l'ARN après extraction est effectué au spectrophotomètre. Pour ce faire, 2 µl de la resuspension d'ARN sont prélevés pour chaque échantillon et 198 µl d'eau RNase free y sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 260 et 280 nm.

7.3. Reverse Transcription

7.3.1. Matériel (tableau II.16)

7.3.2. Méthode

Lors de cette méthode, l'ARN obtenu après extraction d'ARN totale sur cellules MDA-MB-231 est rétrotranscrit en ADNc grâce à une amorce poly-T. Pour chaque échantillon, 1 à 2 µg d'ARN total est engagé dans la reverse transcription, auquel de l'eau RNase free est ajoutée afin d'atteindre un volume total de 12 µl. 1 µl d'oligo dT est ajouté également à chaque échantillon. Les échantillons sont incubés 10 min à 65 °C puis placés sur glace pendant 2 min. Le mix réactionnel (4 µl buffer RT 5X ; 4 µl DNTP ; 0,5 µl protector RNase inhibitor ; 0,5 µl reverse transcriptase) est ensuite préparé et 7 µl de ce mix est ajouté à chaque échantillon. Les échantillons sont incubés pendant 30 min à 55 °C et ensuite spinnés légèrement. Les échantillons sont de nouveau incubés 5 min à 85 °C. Finalement, les échantillons sont conservés à -20°C pour la real-time PCR.

7.4. Real-time PCR

7.4.1. Matériel (tableau II.17 et II.18)

7.4.2. Méthode

Pour chaque gène étudié, un mix est préparé contenant 2,5 µl d'eau milliQ, 2,5 µl d'amorces forward et reverse diluées 3 x et 12,5 µl de Sybr Green. 20 µl de ce mix sont disposés dans chaque puits. A ces 20 µl sont ajoutés 5 µl d'ADNc dilué 100 x dans de l'eau milliQ. Dans les puits servant de contrôles négatifs, 5 µl d'eau milliQ sont ajoutés à la place de l'ADNc dilué.

Lorsque chaque puits est rempli, la plaque est scellée à l'aide d'un film et centrifugée 1 min 30 sec à 1000 rpm. Une fois la plaque centrifugée, elle est placée dans le lecteur de plaques et la real-time PCR peut commencer.

Les valeurs obtenues pour chaque gène sont normalisées par rapport à un gène contrôle, le gène 23 kDa. Ainsi, la moyenne obtenue pour chaque condition du gène étudié est soustraite à celle du gène contrôle pour la même condition. Ensuite, ce delta Ct obtenu est normalisé par

rapport à la condition de normoxie. On obtient alors le $\delta\delta Ct$. Finalement, le fold d'induction est calculé via la formule $2^{-\delta\delta Ct}$.

8. Etude de l'expression de protéines par technique ELISA

8.1. Principe

La technique ELISA permet notamment de mesurer le taux de sécrétion d'une protéine d'intérêt dans le milieu cellulaire. Le principe est le suivant : l'échantillon à tester est incubé dans les puits d'une microplaque coatée avec un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt. L'antigène présent dans l'échantillon sera reconnu par les anticorps. Après une première étape de lavage afin d'éliminer tout contaminant, un anticorps secondaire couplé à la HRP (horseradish peroxidase) est ajouté et reconnaît le fragment Fc de l'anticorps primaire. Après une deuxième étape d'incubation et de lavage, une solution substrat est ajoutée. Elle est composée de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine. Une solution STOP est ensuite ajoutée afin d'arrêter la réaction enzymatique. La densité optique est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm. La technique ELISA permet d'établir une courbe d'étalonnage avec la concentration en IL-8 en fonction de la densité optique.

8.2. Matériel (tableau II.19)

8.3. Méthode

L'expérience a été réalisée à partir de cellules MDA-MB-231 incubées en condition de normoxie, d'hypoxie chronique ou d'hypoxie intermittente et ce, en absence ou en présence du TNF- α . La période d'incubation a été interrompue soit après 6 h, soit le lendemain matin. A la fin de ces deux périodes, le surnageant a été récupéré dans chaque puits et transféré dans un eppendorf. Les échantillons récoltés ont été centrifugés pendant 5 min à 13 000 rpm. De nouveau, le surnageant a été transféré dans d'autres eppendorfs qui ont été conservés à -20 °C jusqu'à leur utilisation pour l'ELISA.

Avant d'effectuer l'ELISA, une courbe d'étalonnage (s'étendant de 0 pg/mL à 2000 pg/mL), différents réactifs et les échantillons ont été préparés. Ainsi, 10 μ l de chaque échantillon est dilué dans 990 μ l de Calibrator Diluent RD5P (1x).

Ensuite, 100 μ l de Assay Diluent RD1-85 est ajouté dans chaque puits. 50 μ l de standard, de blancs et d'échantillons sont ajoutés à ces 100 μ l. Le blanc correspond à un milieu sans cellules, ici, il s'agit du milieu CO₂-indépendant complet ajouté avant l'incubation des cellules (voir point 2). La plaque est ensuite scellée et incubée pendant 2 h à RT.

A la fin de ce temps d'incubation, les puits sont lavés quatre fois dans 300 μ l de Wash Buffer. Par la suite, la plaque est incubée pendant 1h à RT en présence de l'anticorps polyclonal anti-IL-8 conjugué à la horseradish peroxydase. Après cette période d'incubation, les puits sont de nouveau lavés quatre fois dans 300 μ l de Wash Buffer avant d'être incubés pendant 30 min en présence de 200 μ l de solution substrat. Cette solution doit être préparée 15 min avant son utilisation et est composée d'une solution A (le peroxyde d'hydrogène) ainsi que d'une solution B (le tétraméthylbenzidine). La plaque doit être placée à l'abri de la lumière.

Enfin, 50 μ l de solution STOP est déposé dans chaque puits et la densité optique de chaque puits est déterminée dans les 30 min à une longueur d'onde de 450 nm grâce à un spectrophotomètre.

9. Dosage de la concentration totale en protéines par la méthode du Folin

La méthode de Folin combine l'utilisation d'ions Cu^{2+} et du réactif de Folin. Celui-ci est une solution composée d'un mélange d'acide phosphomolybdique et d'acide phosphotungstique. En milieu alcalin, il est réduit par le noyau phénolique des résidus de tyrosines des protéines présentes dans les échantillons à analyser. Afin de rendre la réaction plus sensible et de favoriser le transfert d'électrons, du sulfate de cuivre est ajouté. La réaction donne une coloration bleue permettant un dosage colorimétrique à une longueur d'onde de 740 nm. Cette méthode nous permet de mesurer la quantité totale en protéines dans les lysats cellulaires.

9.1. Matériel (tableau II.20)

9.2. Méthode

L'expérience a été également réalisée à partir de cellules MDA-MB-231 incubées en condition de normoxie, d'hypoxie chronique ou d'hypoxie intermittente et ce, en absence ou en présence du $\text{TNF-}\alpha$. La période d'incubation a été interrompue soit après 6h, soit le lendemain matin. A la fin de ces deux périodes d'incubation, les cellules ont été rincées deux fois au PBS. Ensuite, les cellules ont été mises en présence de 200 μl de NaOH 0,5 N par puits pendant 30 min minimum. Les lysats cellulaires ont été récoltés dans des eppendorfs et congelés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à leur utilisation pour le dosage de protéines par la méthode du Folin. Pour le dosage, la courbe de calibration et les blancs sont préparés dans des tubes à Bradford. 150 μl de NaOH 0,5 N constitue le blanc. La courbe de calibration (100 $\mu\text{g/ml}$ à 400 $\mu\text{g/ml}$) est préparée à partir d'une solution stock BSA à une concentration de 2 mg/ml diluée 2,5x. 150 μl de chaque échantillon est disposé dans un tube à Bradford, y sont ajoutés 750 μl de solution A. Il faut laisser agir la solution pendant 10 min et vortexer. La solution A est préparée juste avant emploi et contient 100 ml de Na_2CO_3 , 1 ml de Tartrate et 1 ml de CuSO_4 . Ensuite, 75 μl de folin (dilué 2x dans de l' H_2O) est ajouté au mélange et l'ensemble est vortexer. Après 30 min, la densité optique est lue à une longueur d'onde de 740 nm au spectrophotomètre.

III. Résultats

Au sein de la masse tumorale en développement, les cellules cancéreuses sont exposées à un microenvironnement pauvre en oxygène et en nutriments. La prolifération incontrôlée des cellules et l'augmentation de la distance de diffusion de l'oxygène diminuent cet apport en oxygène. Les cellules cancéreuses sont exposées dans un premier temps à l'hypoxie chronique. Les effets de l'hypoxie chronique sur les cellules tumorales sont déjà bien caractérisés dans la littérature, le mémoire se focalise donc plutôt sur l'étude des effets de l'hypoxie intermittente. L'hypoxie intermittente se caractérise par des phases d'hypoxie suivies de phases de réoxygénation. Elle apparaît suite à la présence d'un flux tumoral irrégulier au sein de la tumeur et touche les cellules cancéreuses ainsi que les cellules endothéliales.

Des études récentes ont montré que l'hypoxie intermittente protège les cellules cancéreuses contre les traitements anticancéreux. L'hypoxie intermittente peut également avoir des effets différents sur la réponse cellulaire de ceux observés lorsque les cellules cancéreuses sont exposées à l'hypoxie chronique (Toffoli et Michiels, 2008). C'est pourquoi, il est intéressant d'étudier dans le cadre de ce mémoire, les effets encore peu connus de l'hypoxie intermittente sur la réponse cellulaire des cellules cancéreuses. L'hypoxie chronique et intermittente influencent l'expression d'une multitude de gènes via la régulation de facteurs de transcription tels que HIF-1. Celui-ci est très important dans la survie et l'adaptation des cellules à une faible pression partielle en oxygène en favorisant notamment le processus angiogénique (Lisy et Peet, 2008). L'hypoxie chronique et intermittente influencent également l'activité de facteurs de transcription dont Nrf2 et NF- κ B. En effet, ces deux facteurs de transcription sont activés par un stress oxydatif à des niveaux différents de ROS (Gloire et al., 2006). Il est suggéré dans la littérature que, lors de l'hypoxie intermittente, des ROS sont majoritairement produits lors des phases de réoxygénation qui suivent les phases d'hypoxie (Li et Jackson, 2002).

Le modèle cellulaire utilisé afin d'étudier l'influence de l'hypoxie intermittente sur ces deux facteurs de transcription, Nrf2 et NF- κ B, est les cellules tumorales MDA-MB-231. Ce sont des cellules épithéliales humaines qui proviennent d'un adénocarcinome de glande mammaire.

L'activité du facteur de transcription HIF-1 en condition d'hypoxie intermittente a été étudiée au préalable afin de déterminer si les cellules MDA-MB-231 perçoivent la diminution de la pression partielle en oxygène et y répondent en activant HIF-1. L'activité et l'expression protéique de Nrf2 et NF- κ B ainsi que l'expression de leurs gènes cibles en hypoxie intermittente ont été étudiées selon un modèle expérimental très précis.

1. Modèle expérimental

Pour chaque expérience réalisée, les cellules MDA-MB-231 ont été incubées dans trois conditions différentes: en normoxie (N), en hypoxie chronique (HC) ou en hypoxie intermittente (HI) (figure III.1). HIF-1 a été étudié à la fin de la dernière heure d'hypoxie du cycle 4 de l'hypoxie intermittente, c'est-à-dire après 5 h 30 min d'incubation. Par ailleurs, Nrf2 et NF- κ B ont été étudiés à la fin de la dernière phase de réoxygénation de l'hypoxie intermittente, c'est-à-dire après 6 h d'incubation. De plus, Nrf2 et NF- κ B ont aussi été activés par un stimulus bien connu, respectivement t-BHQ (tert-butylhydroquinone ; 50 μ M) ou SIN-1 (3-morpholinosydnonimine ; 1mM) et TNF- α (Tumor-necrosis factor α ; 10 ng/ μ l). De cette façon, l'influence de l'hypoxie intermittente sur les deux facteurs et la réponse cellulaire des cellules MDA-MB-231 a été étudiée en condition basale ou après stimulation par un

activateur chimique. L'influence de la normoxie et de l'hypoxie chronique sur les facteurs de transcription est étudiée en parallèle, afin de caractériser les effets spécifiques de l'hypoxie intermittente.

2. HIF-1

2.1. Influence de l'hypoxie intermittente sur l'abondance nucléaire d'HIF-1

Le but de cette expérience était de vérifier si les cellules MDA-MB-231 peuvent percevoir les conditions d'hypoxie chronique et/ou d'hypoxie intermittente en évaluant l'abondance nucléaire de la sous-unité HIF-1 α du facteur de transcription HIF-1. Cette analyse a été effectuée par western blot à partir d'extraits nucléaires de cellules MDA-MB-231 incubées préalablement en conditions de normoxie (N), d'hypoxie chronique (HC) ou d'hypoxie intermittente (HI) pendant 5 h 30 min. L'extraction nucléaire des cellules a été réalisée après la dernière phase d'hypoxie pour la condition d'hypoxie intermittente afin d'éviter la dégradation de HIF-1 α pendant la phase de réoxygénation.

L'analyse du western blot permet d'observer une bande à 120 kDa correspondant à HIF-1 α dans les extraits nucléaires de cellules MDA-MB-231 incubées en hypoxie chronique ou en hypoxie intermittente mais pas en normoxie (figure III.2). L'abondance d'HIF-1 α est toutefois plus prononcée dans les extraits nucléaires de cellules incubées en hypoxie chronique que dans les extraits nucléaires de cellules exposées à l'hypoxie intermittente. Cette observation s'explique par le fait qu'en hypoxie intermittente, la sous-unité HIF-1 α est dégradée à chaque phase de réoxygénation tandis qu'elle s'accumule pendant toute la période d'incubation en hypoxie chronique (5 h 30 min). Ce phénomène a été démontré lors d'études dans notre laboratoire par Sébastien Toffoli et al. (2007). Elles montrent que la sous-unité HIF-1 α est stabilisée à chaque phase d'hypoxie mais rapidement dégradée à chaque phase de réoxygénation.

Les résultats indiquent que les cellules MDA-MB-231 perçoivent bien l'hypoxie et y répondent par l'activation de HIF-1. Dans la suite de ce travail, nous avons gardé ces conditions expérimentales et étudié l'activation de deux facteurs de transcription impliqués dans la défense contre le stress oxydatif, Nrf2 et NF- κ B.

3. Nrf2

Nrf2 est un facteur de transcription activé par un faible niveau de ROS dans la cellule afin d'induire l'expression d'enzymes neutralisant et détoxifiant ces molécules réactives (Niture et al., 2010). L'influence de l'hypoxie intermittente sur l'activité de Nrf2 et l'expression de ses gènes cibles a été évaluée par différentes approches lors de ce mémoire. L'influence de l'hypoxie intermittente sur chaque phase d'activation de Nrf2 a été étudiée étape par étape tout au long des expériences : depuis sa stabilisation ou non en condition d'hypoxie (western blot) vers sa translocation dans le noyau (marquage par immunofluorescence). Ensuite, son activité de liaison à l'ADN (Trans-AM) et son activité transcriptionnelle (système rapporteur) ont été étudiées. Enfin, l'expression de ses gènes cibles (RT-PCR en temps réel) a également été analysée. Pour cela, les effets de l'hypoxie intermittente ont été étudiés simultanément dans les cellules en condition basale ou en présence du t-BHQ ou du SIN-1, des activateurs classiques de Nrf2. Pour chaque expérience, les cellules ont donc été incubées en normoxie (N), en hypoxie chronique (HC) ou en hypoxie intermittente (HI) en absence ou en présence de t-BHQ ou de SIN-1.

3.1. Influence de l'hypoxie intermittente sur l'abondance nucléaire de Nrf2

La première approche, afin d'étudier l'influence de l'hypoxie intermittente sur Nrf2, consistait à détecter sa présence dans des extraits nucléaires de cellules MDA-MB-231 par western blot. Les résultats sont présentés à la figure III.3. Une bande à 101 kDa est observée, qui pourrait correspondre à Nrf2. Le poids moléculaire théorique attendu est de 57 kDa mais il a déjà été observé dans d'autres études que le poids moléculaire apparent de Nrf2 pouvait être de 100 kDa (Li et al., 2005 ; Kim et al., 2007). Ce poids moléculaire élevé pourrait représenter la formation d'un dimère Nrf2/actine ou une modification post-traductionnelle telle que la polyubiquitinylation. En effet, Keon Kang et al. (2002) ont montré que le complexe Nrf2/actine transloque dans le noyau en condition de stress oxydatif. La voie de signalisation PI3-kinase serait impliquée dans le réarrangement des microfilaments d'actine en réponse au stress oxydatif. Dans ce complexe Nrf2/actine, l'actine est une protéine d'un poids moléculaire de 43 kDa. Jiang Li et al. (2005) suggèrent une forme polyubiquitinylée de Nrf2 stabilisée en condition de stress oxydatif. Le poids moléculaire d'une protéine ubiquitine est d'environ 8,6 kDa, la liaison covalente d'un tétramère d'ubiquitine au facteur Nrf2 nous donnerait un poids moléculaire d'environ 100 kDa.

Une augmentation de l'abondance nucléaire de Nrf2 est observée dans les cellules incubées en hypoxie chronique ou en hypoxie intermittente, ceci en condition basale. Lorsque les cellules sont incubées en présence du t-BHQ seul, celui-ci augmente fortement l'abondance de Nrf2 dans le compartiment nucléaire. Par contre, on peut constater que l'hypoxie chronique et l'hypoxie intermittente n'augmentent pas cet effet du t-BHQ. Ces résultats doivent cependant être pris avec précaution car l'intensité des bandes du contrôle de charge NUP-98 varie légèrement de piste à piste.

3.2. Influence de l'hypoxie intermittente sur la localisation subcellulaire de Nrf2

Afin de confirmer les résultats obtenus par western blot, nous avons analysé la localisation subcellulaire de Nrf2 et son abondance en hypoxie intermittente par marquage en immunofluorescence. La présence de Nrf2 dans les cellules a été révélée grâce à l'utilisation d'un anticorps anti-Nrf2. Le marquage au Topro3 permet de visualiser les noyaux cellulaires. L'observation au microscope confocal (figure III.4) nous informe que Nrf2 se localise à la fois dans les compartiments cytoplasmique et nucléaire lorsque les cellules sont incubées en hypoxie chronique ou en hypoxie intermittente et ce, en absence de t-BHQ. La translocation nucléaire de Nrf2 est induite dans les cellules incubées en présence de t-BHQ en normoxie. Toutefois, la translocation n'est pas complète puisque le facteur de transcription est encore présent dans le cytosol. L'hypoxie intermittente ne modifie pas l'effet du t-BHQ sur la translocation nucléaire du facteur.

Comme précédemment, cette analyse semble indiquer que l'hypoxie intermittente et l'hypoxie chronique augmentent l'abondance nucléaire de Nrf2. Toutefois, la protéine est toujours présente dans le cytoplasme. Il semble donc que la translocation de Nrf2 du cytoplasme vers le noyau ne soit pas complète en condition basale.

On peut remarquer également que l'abondance nucléaire de la protéine est augmentée après stimulation de Nrf2 avec le t-BHQ seul. Cet effet du t-BHQ n'est pas modifié dans les cellules incubées en hypoxie chronique ni en hypoxie intermittente. De nouveau, la translocation nucléaire de Nrf2 est incomplète.

3.3. Influence de l'hypoxie intermittente sur l'activité de liaison à l'ADN de Nrf2

Comme les études précédentes semblent indiquer que l'hypoxie intermittente pourrait mener à une légère augmentation de l'abondance nucléaire de Nrf2, nous avons voulu savoir si cette augmentation se traduisait en une augmentation de l'activité de Nrf2. Pour se faire, l'activité de liaison à l'ADN a tout d'abord été mesurée par Trans-AM. Cette technique permet de quantifier la liaison de Nrf2 à sa séquence consensus ARE sur des oligonucléotides trappeurs. L'expérience a été réalisée à partir d'extraits nucléaires de cellules MDA-MB-231 et a été répétée trois fois de façon indépendante.

Les résultats obtenus sont présentés à la figure III.5. L'hypoxie intermittente semble augmenter, d'environ deux fois, l'activité de liaison à l'ADN de Nrf2 par rapport aux cellules incubées en normoxie. Cet effet n'est pas observé en hypoxie chronique. Le t-BHQ seul a un effet considérable sur l'activité de liaison à l'ADN de Nrf2 puisqu'il induit une augmentation de cette activité de quatre fois. Cet effet du t-BHQ n'est pas modifié dans les cellules exposées à l'hypoxie chronique ou à l'hypoxie intermittente.

Ces résultats sont tout à fait en corrélation avec les résultats obtenus précédemment concernant l'abondance nucléaire de Nrf2 en condition basale et en hypoxie intermittente. L'abondance nucléaire et l'activité de liaison à l'ADN de Nrf2 sont augmentées dans les cellules incubées en hypoxie intermittente, ce qui n'est pas observé en condition d'hypoxie chronique. Par contre, en condition de stimulation, l'hypoxie chronique et l'hypoxie intermittente n'augmentent pas l'effet du t-BHQ sur l'abondance et l'activité de liaison à l'ADN.

3.4. Etude de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription Nrf2 par système rapporteur

L'étude de l'activité de liaison à l'ADN par Trans-AM ne nous renseigne que sur la capacité d'un facteur de transcription à reconnaître et à se lier à sa séquence consensus. Elle ne nous renseigne pas sur l'état d'activité transcriptionnelle de ce facteur. Afin de déterminer si Nrf2 est actif transcriptionnellement en hypoxie intermittente, un système rapporteur a été utilisé.

Pour se faire, les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec un plasmide contenant le gène rapporteur de la luciférase firefly sous le contrôle d'un promoteur artificiel composé de la séquence consensus ARE reconnue par Nrf2. Ce plasmide pARE-Luciférase donne le niveau d'activité transcriptionnelle de Nrf2. Un deuxième plasmide est transfecté simultanément, le plasmide pRL-SV40 (Simian Virus 40), dont le gène rapporteur codant pour la luciférase de Renilla (RL ; Renilla Luciferase) est sous le contrôle d'un promoteur fort et constitutif. Il est utilisé pour la normalisation des résultats.

Les cellules transfectées ont été incubées en conditions de normoxie (N), d'hypoxie chronique (HC) ou d'hypoxie intermittente (HI) pendant 6 h en présence ou en absence du SIN-1 à une concentration de 1mM et remises en condition de normoxie pour 16 h. Le SIN-1 est utilisé comme activateur de Nrf2 au lieu du t-BHQ à cause de la cytotoxicité de celui-ci à long terme.

Avant de stimuler les cellules avec du SIN-1, nous avons vérifié qu'il n'était pas cytotoxique (données non montrées). Pour cela, les cellules MDA-MB-231 ont été incubées en présence de différentes concentrations de SIN-1 pendant 6 h et leur viabilité a été mesurée grâce au MTT (Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium). A partir de ces résultats, nous avons choisi la concentration de 1 mM.

L'analyse des résultats (figure III.6) indique que l'hypoxie chronique et l'hypoxie intermittente n'ont pas d'effet sur l'activité transcriptionnelle de Nrf2. Par contre, l'incubation des cellules en présence du SIN-1 en normoxie augmente fortement l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription par rapport aux cellules incubées en normoxie seule. En effet, l'activité transcriptionnelle est augmentée d'environ quatre fois. L'effet du SIN-1 sur l'activité transcriptionnelle est diminué en hypoxie chronique et nettement diminué en hypoxie intermittente.

Précédemment, nous avons mis en évidence en condition basale que l'hypoxie intermittente augmente l'abondance nucléaire et l'activité de liaison à l'ADN de Nrf2. Dans cette même condition, l'étude de l'activité transcriptionnelle de Nrf2 n'a révélé aucun effet de l'hypoxie intermittente. De même, il a été observé que la stimulation de Nrf2 au SIN-1 n'augmente pas son activité transcriptionnelle en hypoxie intermittente, elle est d'ailleurs diminuée. Tandis qu'il a été observé que l'hypoxie intermittente ne modifie pas l'effet du t-BHQ sur l'abondance nucléaire et l'activité de liaison de Nrf2.

3.5. Etude de l'expression de gènes cibles de Nrf2 par RT-PCR en temps réel

Afin de confirmer ces résultats, nous avons ensuite décidé de suivre l'expression d'ARNm de gènes cibles de Nrf2 par RT-PCR en temps réel. Des extraits totaux d'ARN de cellules MDA-MB-231 ont été rétrotranscrits en ADNc à partir duquel la RT-PCR en temps réel a été effectuée. Cette méthode permet d'évaluer le niveau d'expression d'un gène d'intérêt dans différentes conditions grâce à l'utilisation d'un agent intercalant, le Sybr Green.

Les deux gènes cibles de Nrf2 étudiés sont les gènes HO-1 (codant pour l'hème-oxygénase) et NQO1 (codant pour la NAD(P)H : quinone oxydoréductase 1). Le gène utilisé pour la normalisation des résultats est le gène 23 kDa.

Les résultats obtenus pour le suivi de l'expression de ces deux gènes cibles sont présentés à la figure III.7.

En ce qui concerne le premier gène cible étudié, HO-1, on peut constater premièrement que son expression est augmentée à la fois en hypoxie chronique et en hypoxie intermittente par rapport aux cellules incubées en normoxie. L'expression est plus particulièrement élevée en hypoxie chronique où elle est augmentée de trois fois. La présence du t-BHQ seul augmente très fortement l'expression de ce gène. Par contre, cet effet du t-BHQ n'est pas augmenté en conditions d'hypoxie chronique ou d'hypoxie intermittente. L'expression du gène est même considérablement diminuée dans ces deux dernières conditions.

Quant à l'expression du gène NQO1, elle est augmentée d'environ trois fois dans les cellules exposées à l'hypoxie chronique ou à l'hypoxie intermittente. Son expression est également augmentée en présence du t-BHQ seul. L'incubation des cellules en hypoxie chronique ou en hypoxie intermittente en présence du t-BHQ ne semble pas beaucoup affecter l'effet du t-BHQ.

Selon ces résultats, l'expression des deux gènes cibles étudiés est augmentée dans la condition d'hypoxie intermittente en absence de stimulation du facteur Nrf2. L'augmentation de l'expression de HO-1 est encore plus marquée dans les cellules exposées à l'hypoxie chronique. L'effet du t-BHQ sur l'expression du gène HO-1 est diminuée dans les cellules incubées en hypoxie chronique ou en hypoxie intermittente. Cet effet est par contre faiblement modifié dans les mêmes conditions, en ce qui concerne le gène NQO1.

3.6. Conclusion intermédiaire

De part ces différentes expériences réalisées, il est déjà possible de conclure qu'en condition basale, l'hypoxie intermittente a un effet stimulant sur l'activité de Nrf2. En effet, nous avons montré une augmentation de son abondance nucléaire et son activation lorsque les cellules sont incubées en condition d'hypoxie intermittente. Ces résultats sont repris dans le tableau III.1. Ainsi, le suivi de l'expression protéique par western blot et marquage en immunofluorescence a révélé une augmentation de l'abondance nucléaire de la protéine. Cette augmentation ne semble pas être spécifique à l'hypoxie intermittente puisqu'elle est également observée en hypoxie chronique.

La mesure de l'activité de Nrf2 a été effectuée, d'une part, par l'étude de l'activité de liaison à l'ADN et d'autre part, par l'analyse de l'activité transcriptionnelle de Nrf2. Il a été mis en évidence que l'activité de liaison à l'ADN est augmentée en hypoxie intermittente tandis que l'activité transcriptionnelle n'est pas modifiée dans cette même condition ou en hypoxie chronique. L'augmentation de l'activité de liaison à l'ADN serait spécifique de l'hypoxie intermittente. Le suivi de l'expression des gènes cibles de Nrf2, HO-1 et NQO1, a montré une influence de l'hypoxie intermittente sur l'expression de ces deux gènes avec un effet plus prononcé de l'hypoxie chronique pour le gène HO-1. L'induction de l'expression des deux gènes n'est pas spécifique de l'hypoxie intermittente.

Lorsque les cellules sont stimulées, on peut conclure de manière générale que l'hypoxie intermittente n'influence pas ou diminue même l'effet du t-BHQ. Donc, l'hypoxie intermittente n'a pas d'effet sur l'activité de Nrf2 déjà augmentée après stimulation du facteur au t-BHQ ou au SIN-1. Ainsi, l'hypoxie intermittente ne semble pas influencer l'abondance et la localisation nucléaire de Nrf2 dans les cellules MDA-MB-231. De même, aucun effet n'est observé lors de l'étude de l'activité de liaison à l'ADN de Nrf2. Par ailleurs, l'hypoxie intermittente semble diminuer l'effet du SIN-1 sur l'activité transcriptionnelle de Nrf2. Cette observation semble être d'autant plus spécifique à l'hypoxie intermittente. Ainsi, l'effet du t-BHQ sur l'activité de la protéine n'est pas augmenté en hypoxie intermittente. Il a également été mis en évidence que l'hypoxie intermittente diminue l'effet du t-BHQ sur l'expression des gènes HO-1 et NQO1. Cette diminution est encore plus marquée pour le gène HO-1. Cet effet n'est pas spécifique à l'hypoxie intermittente puisqu'il est également observé en hypoxie chronique.

4. NF-κB

Un stress oxydatif modéré est responsable de l'activation du facteur de transcription NF-κB qui est alors responsable de l'initiation d'une réponse inflammatoire (Gloire et al, 2006). En effet, l'accumulation de ROS peut générer des dommages oxydatifs au niveau de la cellule et donc induire une réponse inflammatoire via l'activation de NF-κB. NF-κB induit l'expression de nombreux gènes dont les cytokines, les chémokines, les inhibiteurs d'apoptose,... Au cours de ce mémoire, l'influence de l'hypoxie intermittente sur l'activité de NF-κB et l'expression de ses gènes cibles a également été évaluée par différentes approches. Ainsi, comme expliqué dans le cas de l'étude du facteur de transcription Nrf2, une certaine logique a été suivie tout au long des expériences afin d'étudier étape par étape l'influence de l'hypoxie intermittente sur chaque phase d'activation de NF-κB : depuis sa stabilisation ou non en condition d'hypoxie (western blot) vers sa translocation dans le noyau (marquage par immunofluorescence). Par la suite, son activité de liaison à l'ADN (Trans-AM) et son activité transcriptionnelle (système rapporteur) ont été étudiées avant d'analyser l'expression de ses

gènes cibles (RT-PCR en temps réel). Enfin, l'expression protéique de la chémokine IL-8 a également été déterminée. Pour chaque expérience, les effets de l'hypoxie intermittente ont été étudiés simultanément dans les cellules en condition basale ou en présence du TNF- α , un activateur classique de NF- κ B. Les cellules ont donc été incubées en normoxie (N), en hypoxie chronique (HC) ou en hypoxie intermittente (HI) en présence ou en absence de TNF- α à une concentration de 10 ng/ μ l.

4.1. Influence de l'hypoxie intermittente sur l'abondance nucléaire de NF- κ B

Afin de suivre l'expression protéique du facteur de transcription NF- κ B en condition d'hypoxie intermittente, nous avons étudié sa présence dans des extraits nucléaires de cellules MDA-MB-231 par western blot. Les résultats sont présentés à la figure III.8. La présence de NF- κ B dans les extraits nucléaires est révélée grâce à l'utilisation d'un anticorps primaire dirigé contre la sous-unité p65.

Les résultats montrent que l'hypoxie chronique et l'hypoxie intermittente n'ont pas d'effet sur l'abondance nucléaire de NF- κ B par rapport à la normoxie. Par contre, lorsque les cellules sont incubées en présence du TNF- α en condition de normoxie, le TNF- α seul augmente fortement l'abondance nucléaire de la sous-unité p65. L'effet du stimulateur chimique semble être encore augmenté lorsque les cellules sont exposées à l'hypoxie chronique, tandis que l'hypoxie intermittente n'a pas d'effet. Cependant, ces résultats doivent être pris avec précaution au vu de la variabilité de l'intensité des bandes obtenue pour le contrôle de charge.

4.2. Influence de l'hypoxie intermittente sur la localisation subcellulaire de NF- κ B

Suite à l'étude de l'abondance nucléaire de NF- κ B réalisée par western blot, nous avons suivi la localisation de NF- κ B et son abondance dans les cellules grâce au marquage en immunofluorescence. La localisation de NF- κ B dans le cytoplasme et le noyau des cellules a été mise en évidence par un anticorps anti-p65. Les images obtenues après l'observation au microscope confocal sont présentées en figure III.9. Sur ces images, on observe que NF- κ B est localisé principalement dans le cytoplasme des cellules incubées en hypoxie chronique ou en hypoxie intermittente. Par contre, en présence du TNF- α seul, NF- κ B est transloqué dans le compartiment nucléaire des cellules incubées en normoxie. L'effet du TNF- α sur la translocation nucléaire de la protéine est augmenté dans les cellules incubées en hypoxie chronique ou en hypoxie intermittente. Toutefois, la protéine est toujours également présente dans le cytoplasme.

Il semble que l'hypoxie chronique et l'hypoxie intermittente n'ont pas d'effet sur l'abondance nucléaire de la sous-unité p65, comme cela avait déjà été observé lors de l'étude de l'abondance nucléaire par western blot. Dans les cellules incubées en présence du TNF- α , une augmentation de l'abondance nucléaire de NF- κ B est observée pour les deux techniques. De plus, une augmentation de l'effet du TNF- α sur l'abondance nucléaire a été mise en évidence en hypoxie chronique, comme observé précédemment. L'influence de l'hypoxie intermittente sur le TNF- α est uniquement observé pour le marquage en immunofluorescence. En outre, la translocation nucléaire de NF- κ B ne semble pas être complète.

4.3. Influence de l'hypoxie intermittente sur l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B

Etant donné que les études précédentes n'ont pas mis en évidence d'effet de l'hypoxie intermittente sur l'abondance nucléaire en condition basale mais uniquement en condition stimulée (en ce qui concerne les résultats obtenus pour le marquage en immunofluorescence), nous avons voulu étudier l'activité du facteur NF- κ B. Nous avons voulu savoir premièrement si l'activité de liaison est modifiée en condition basale ou dans les cellules stimulées.

L'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B a été mesurée par Trans-AM, cette expérience a été réalisée trois fois de manière indépendante. Les résultats de l'expérience sont présentés à la figure III.10. Ils nous indiquent que l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B est fortement augmentée, d'environ 6 fois, dans les cellules incubées en condition d'hypoxie intermittente par rapport aux cellules incubées en condition de normoxie. Le TNF- α seul a également un effet positif sur l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B puisqu'elle est augmentée d'environ quatre fois dans les cellules stimulées. L'hypoxie chronique et l'hypoxie intermittente augmentent d'environ trois à quatre fois l'effet du TNF- α sur l'activité de liaison à l'ADN de la protéine.

Ces résultats ne sont pas en corrélation avec ceux obtenus pour l'abondance nucléaire.

Aucun effet de l'hypoxie intermittente n'a été observé sur l'abondance nucléaire, alors que l'activité de liaison à l'ADN est augmentée dans cette même condition. Lorsque les cellules sont stimulées, une influence de l'hypoxie intermittente sur l'effet du TNF- α , en ce qui concerne l'abondance nucléaire, a été uniquement observée pour le marquage en immunofluorescence. Ce résultat est en corrélation avec l'augmentation de l'effet du TNF- α sur l'activité de liaison à l'ADN en hypoxie intermittente.

Par ailleurs, ces résultats indiquent que la protéine est capable de se lier à sa séquence consensus en hypoxie intermittente dans les conditions basale ou stimulée.

4.4. Etude de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B par système rapporteur

La mesure de l'activité de NF- κ B a également été suivie au niveau de l'activité transcriptionnelle de la protéine par système rapporteur.

Pour cette expérience, les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec le plasmide p κ B-Luciférase contenant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle d'un promoteur artificiel composé de la séquence consensus κ B reconnue spécifiquement par NF- κ B. Ce plasmide renseigne sur le niveau d'activité transcriptionnelle de NF- κ B. Un deuxième plasmide est transfecté également, le plasmide pRL-SV40 qui est utilisé pour la normalisation des résultats.

Suite à l'analyse des résultats (figure III.11), nous remarquons que ni l'hypoxie intermittente ni même l'hypoxie chronique n'ont d'effet sur l'activité transcriptionnelle de NF- κ B. Son activité est d'ailleurs légèrement diminuée en hypoxie intermittente. Par contre, une faible augmentation de l'activité transcriptionnelle est observée dans les cellules incubées en présence de TNF- α et en normoxie. L'effet du TNF- α n'est pas modifié dans les cellules exposées soit en hypoxie chronique, soit en hypoxie intermittente.

D'après ces résultats et ceux obtenus précédemment, il semble que l'hypoxie intermittente n'a pas d'influence sur l'abondance nucléaire et l'activité transcriptionnelle de NF- κ B lorsque les cellules sont stimulées, alors qu'un effet dans la même condition a été observé sur l'activité de liaison à l'ADN. Par contre, dans les cellules stimulées, il est observé que l'hypoxie intermittente ne modifie pas l'effet du TNF- α à la fois sur l'abondance nucléaire, en ce qui concerne les résultats obtenus par western blot, et l'activité transcriptionnelle de NF- κ B. Une

augmentation de l'effet du TNF- α en hypoxie intermittente est observée sur la translocation nucléaire et l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B.

4.5. Etude de l'expression des gènes cibles de NF- κ B par RT-PCR en temps réel

L'activité transcriptionnelle de NF- κ B a également été étudiée au niveau de l'expression des ARNm de ses gènes cibles par RT-PCR en temps réel. Pour se faire, des extraits totaux d'ARN ont été isolés à partir de cellules MDA-MB-231 et rétrotranscrits en ADNc. La RT-PCR en temps réel a été effectuée à partir de cet ADNc obtenu après rétrotranscription.

Les deux gènes cibles de NF- κ B étudiés sont les gènes IL-8 (codant pour l'interleukine-8) et MCP-1 (codant pour la chémokine « Monocyte Chemotactic Protein-1 »). Le gène 23 kDa a été utilisé pour la normalisation des résultats. Les résultats obtenus pour cette expérience sont présentés à la figure III.12.

L'analyse de l'expression du gène IL-8 indique une augmentation de son expression d'environ deux fois dans les cellules incubées en hypoxie chronique ou en hypoxie intermittente. L'expression du gène est très fortement augmentée dans les cellules incubées en présence du TNF- α et en normoxie. Cet effet du TNF- α est augmenté spécifiquement dans les cellules incubées en hypoxie intermittente.

Les résultats obtenus pour le gène MCP-1 montrent que son expression est augmentée à la fois en conditions d'hypoxie chronique et d'hypoxie intermittente. Toutefois, cette augmentation est plus prononcée, d'environ cinq fois, dans les cellules exposées à l'hypoxie intermittente. Le TNF- α ne semble pas avoir d'effet sur l'expression du gène en condition de normoxie. Par contre, l'hypoxie chronique et l'hypoxie intermittente augmentent l'effet du TNF- α . D'ailleurs, l'influence de l'hypoxie chronique est plus importante, d'environ 9 fois.

Ainsi, en condition basale, l'hypoxie intermittente semble augmenter l'expression des deux gènes. L'augmentation de l'expression de MCP-1 est plus importante en hypoxie intermittente qu'en hypoxie chronique. L'effet du TNF- α sur l'expression des deux gènes est augmentée en hypoxie chronique et en hypoxie intermittente. Toutefois, l'influence de l'hypoxie intermittente sur l'effet du TNF- α est plus prononcée en ce qui concerne le gène IL-8. Par ailleurs, l'hypoxie chronique augmente plus fortement l'effet du TNF- α sur l'expression du gène MCP-1.

4.6. Etude de l'expression protéique d'IL-8, régulée par NF- κ B

L'étude de l'expression de protéines telles que la chémokine IL-8 est une autre manière de déterminer l'activité transcriptionnelle de NF- κ B. De plus, précédemment, une augmentation de l'expression du gène IL-8 a été observée dans les cellules incubées en hypoxie intermittente. Nous voulions savoir par cette expérience si cette augmentation de l'expression en ARNm se traduit en une augmentation de l'expression de la protéine IL-8.

Les cellules ont été incubées en normoxie (N), en hypoxie chronique (HC) ou en hypoxie intermittente (HI) pendant 6 h en condition basale ou en présence du stimulateur TNF- α (10 ng/ μ l). Le taux de sécrétion d'IL-8 dans le milieu a été déterminé par un test ELISA après 6 h d'incubation et 16 h après la fin de l'incubation. Le dosage de protéines totales par la méthode de Folin a été effectué afin de normaliser les résultats obtenus par le test ELISA.

Les résultats, présentés à la figure III.13, ne montrent aucune sécrétion basale d'IL-8 par les cellules MDA-MB-231. Aucun effet de l'hypoxie intermittente sur l'expression de la protéine IL-8 en condition basale n'est observé, et ceci, que le test ELISA ait été effectué directement après l'incubation ou le lendemain. Dans les deux situations, l'incubation des cellules en

	Facteur cible	Concentration finale
t-BHQ (tert-butylhydroquinone, Fluka)	Nrf2	50 μ M
SIN-1 (3-morpholinosydnonimine, Invitrogen Molecular Probes, USA)	Nrf2	1 mM
TNF-α (tumour-necrosis factor α , R&D 210-TA)	NF κ B	10 ng/ μ l

Tableau II. 1 : Les différents stimulateurs chimiques des deux facteurs de transcription étudiés.

Milieu CO ₂ -indépendant complet	Milieu CO ₂ -indépendant (Gibco, UK)
	L-Glutamine (Sigma, USA) (36 mg pour 500 ml de milieu)
Ethanol stérile (Merck, Allemagne)	

Tableau II. 2 : Matériel requis pour l'incubation des cellules dans les trois conditions.

Plaques 24 puits (Costar, Corning, USA)	
Lamelles couvre-objets rondes de 13 mm de diamètre (Assitent, GER)	
Lames porte-objets 26 x 76 cm (SuperFrost, VWR International, USA)	
PBS pour 1 l	9 gr NaCl (Merck, GER)
	20 ml tampon phosphate (0,5 M) pH 7,4
	H ₂ O ₂
BSA 2 % (Bovine Serum Albumin, PAA Laboratories, GER)	
Paraformaldéhyde 4 %	4 gr PFA (Merck, GER) dans 100 ml PBS en chauffant
Triton X-100 1 % (Merck, GER)	
Topro-3 (Invitrogen Molecular Probes, USA)	
Solution de RNase 2 mg/ml en PBS	
Mowiol (Sigma-Aldrich), GER-UK)	
Microscope confocal à fluorescence (Leica, GER)	

Tableau II. 3 : Matériel requis pour le marquage en immunofluorescence.

	Anticorps primaire	Espèce	Anticorps secondaire
Nrf2	Anti-Nrf2 (sc-13032) (dilué 100 x)	Lapin (polyclonal)	Anti-IgG de lapin couplé à l'Alexa 488 nm (dilué 1000 x) (Molecular Probes, USA)
NFκB (p65)	Anti-p65 (sc-372) (dilué 100 x)	Lapin (polyclonal)	Anti-IgG de lapin couplé à l'Alexa 488 nm (dilué 1000 x) (Molecular Probes, USA)

Tableau II. 4 : Les anticorps primaires et secondaires utilisés lors du marquage en immunofluorescence.

PBS (1 l)	<ul style="list-style-type: none"> • 9 gr NaCl (Merck, GER) • 20 ml tampon phosphate 0.5 M pH 7,4
PBS + 1 mM Na ₂ MoO ₄ + 5 mM NaF (100 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 100 ml PBS • 24 mg Na₂MoO₄ (Sigma, USA) • 21 mg NaF (Merck, GER)
Tampon hypotonique (HB) 10x (pour 1 l)	<ul style="list-style-type: none"> • 2,1 gr NaF (50 mM, Merck, GER) • 2,42 gr Na₂MoO₄ (10 mM, Sigma, USA) • 47,5 gr Hepes (200 mM; Acros Organics) • 0,37 gr EDTA (1 mM, Merck, GER) • pH 7,9
Tampon de lyse 0,5 % NP-40 (pour 100 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 10 ml HB 10x • 500 µl NP-40 (Sigma, USA) • 89,5 ml H₂O
Tampon RE (100 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 10 ml HB 10x • 20 ml glycérol 87 % (Merck, GER) • 70 ml H₂O
Tampon SA (0,8 M NaCl) (100 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 10 ml HB10x • 20 ml glycérol 87 % (Sigma, USA) • 20 ml NaCl 4 % (7,01 g/30 ml H₂O) (Merck, GER) • 50 ml H₂O
RE complet	<ul style="list-style-type: none"> • 1 ml tampon RE • 40 µl PIC (protease inhibitor cocktail) (Complete, Roche) • 40 µl PIB (phosphatase inhibitor buffer)
SA complet	<ul style="list-style-type: none"> • 1 ml tampon SA • 40 µl PIC (Complete protease inhibitor cocktail tablets, Roche, GER) <ul style="list-style-type: none"> ➤ une tablette à dissoudre dans 2 ml H₂O • 40 µl PIB (phosphatase inhibitor buffer): <ul style="list-style-type: none"> ➤ 25 mM Na₃VO₄ (Sigma-Aldrich, USA) ➤ 250 mM p-nitrophenylphosphate (Sigma, USA) ➤ 250 mM β-glycérophosphate (Sigma-Aldrich, USA) ➤ 125 mM NaF pour 10 ml (Merck, GER)

Tableau II. 5 : La composition des différentes solutions utilisées pour l'extraction nucléaire.

Colorant Bio-Rad Protein Assay 5x (Bio-Rad Laboratories, USA)
Etalon BSA (Bovine Serum Albumine) (2 µg/µl) (Thermo Fisher Scientific, USA)
Spectrophotomètre
Tubes Bradford

Tableau II. 6 : Matériel utilisé lors du dosage de la concentration en protéines par la méthode de Bradford.

Etalon BSA (Bovine Serum Albumine) (2 mg/ml) (Thermo Fisher Scientific, USA)
Réactif Pierce 660 nm Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, USA)
Plaques 96 puits Elisa (Greiner bio-one, Autriche)
Multichannel (Labosystems)
Spectrophotomètre (Ultramarck Microplate Imaging System, Bio-Rad)

Tableau II. 7 : Matériel requis lors du dosage de la concentration en protéines par la méthode de Pierce.

Support de plaques, deux plaques de verre (10x8 cm, 10x7 cm)
Peigne
Isopropanol-isobutanol (Merck, GER)
Cuve d'électrophorèse
Générateur (Bio-Rad Power PAC 300)
Bloc chauffant 100 °C
Etalon de poids moléculaire (Odyssey Li-cor Biosciences)
Méthanol 100% (Accros Organics)
Membrane de transfert immobilon PDVF-LF (Amersham Biosciences, USA)
Eponges
Appareil de transfert (Amersham Biosciences, USA)
Agent bloquant Odyssey Li-cor (Li-Cor Biosciences)
Agent bloquant Odyssey Li-cor + tween 0,1 % (Sigma-Aldrich)
Papier Whatman (Merck, GER)
Appareil Li-cor Odyssey (Li-cor Biosciences)

Tableau II. 8 : Matériel requis pour l'électrophorèse, le transfert sur membrane et le traitement de la membrane.

Running gel buffer (200 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 36,3g Tris (Merck, GER) • 0,8 g SDS (MP Biomedicals, USA) • pH 8,9
Running gel mix 10 % (35 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 3,75 ml Running gel buffer • 6 ml Acryl/bis (Bio-Rad, USA) • 4,5 ml H₂O
Gel séparateur	<ul style="list-style-type: none"> • 14,25 ml Running gel mix 10 % • 750 µl APS 1 % (PlusOne Amersham, GE Healthcare, UK) • 15 µl TEMED (tetra-methyl-éthylènediamine, PlusOne Amersham, GE Healthcare, UK)
Spacer gel buffer (200 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 10,2 g Tris (Merck, GER) • 40 g Glycine (Merck, GER) • 10 g SDS (MP Biomedicals, USA) • pH 6,8
Spacer gel mix	<ul style="list-style-type: none"> • 1,875 ml Spacer gel buffer • 0,75 ml Acryl/bis (Bio-Rad, USA) • 4,125 ml H₂O
Gel concentrateur	<ul style="list-style-type: none"> • 6,75 ml Spacer gel mix • 750 µl APS 25 % • 7,5 µl TEMED (tetra-methyl-éthylènediamine, PlusOne Amersham, GE Healthcare, UK)
Running buffer 10x (1 l)	<ul style="list-style-type: none"> • 30 g Tris (Merck, GER) • 140 g Glycine (Merck, GER) • 10 g SDS (MP Biomedicals, USA)
Blotting buffer (5 l)	<ul style="list-style-type: none"> • 24 g Tris (Merck, GER) • 115g Glycine (Merck, GER) • 1 l methanol (Merck, GER)
Bleu de charge 5x NuPage	<ul style="list-style-type: none"> • 10 ml Spacer gel buffer • 10 ml SDS 20 % (MP Biomedicals, FR) • 5 ml β-mercaptoéthanol (FlukaChemi AG, SWZ) • 10 ml glycerol (Merck, GER) • 17,5 ml bleu de bromophénol (Jansens Chemicals)
PBS (1 l)	<ul style="list-style-type: none"> • 9 gr NaCl (Merck, GER) • 20 ml tampon phosphate (0,5 M, pH7,4) • H₂O
PBS-Tween 0,1 % (500 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 500 ml PBS • 500 µl Tween-20 (Sigma-Aldrich)

Tableau II. 9: Composition des différentes solutions utilisées lors de l'électrophorèse, du transfert sur membrane et du traitement de la membrane.

	Anticorps primaire	Espèce	Anticorps secondaire
Nrf2	Anti-Nrf2 (sc-13032) (dilution 1000 x)	Lapin (polyclonal)	Anti-IgG de lapin couplé au fluorochrome 700 nm (dilution 7500 x)
NFκB (p65)	Anti-p65 (sc-372) (dilution 5000 x)	Lapin (polyclonal)	Anti-IgG de lapin couplé au fluorochrome 700 nm (15 000 x)
nucléoporine	Anti-NUP-98 (C39A3) (dilution 1000 x)	Lapin (monoclonal)	Anti-IgG de lapin couplé au fluorochrome 800 nm (dilution 10 000 x)

Tableau II. 10 : Les différents anticorps primaires et secondaires utilisés lors du western blot odyssey li-cor.

Plaques 24 puits coatées avec la sonde d'intérêt
Pipette multichannel (Labosystems)
Tips BioHit (finlande)
BSA Fraction V (Sigma)
Solution TMB (tétraméthylbenzidine ; Biosources, Belgique)
Solution Stop (HCl) (Biosources, Belgique)
Spectrophotomètre (Ultramarck Microplate Imaging System, Bio-Rad)

Tableau II. 11 : Matériel utilisé lors du dosage de l'activité de liaison à l'ADN par Trans-AM.

Solutions	Trans-AM Nrf2	Trans-AM NFκB
<u>Tampon de binding concentré</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Hepes 2 mM • EDTA 0,2 mM • NaCl 8 mM • Glycérol 12 % • H₂O • pH 7,5 	<ul style="list-style-type: none"> • Hepes 10 mM • KCl 300 mM • Glycérol 20 % • H₂O • pH 7,5
<u>Tampon de binding complet</u>	<ul style="list-style-type: none"> • 1 ml tampon de binding concentré • 2 µl DTT 1M 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 ml tampon de binding concentré • 500 µl BSA 5 % • 500 µl DSS 0,05 mg/ml • 500 µl H₂O • 5 µl DTT 1M
<u>Tampon de lyse</u>	<ul style="list-style-type: none"> • 800 µl tampon RE • 200 µl tampon SA • 40 µl PIC • 40 µl PIB 	<p><u>Tampon de lyse stock:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Hepes 20 mM • NaCl 350 mM • MgCl₂ 1 mM • EDTA 0,5 mM • EGTA 0,1mM • Glycérol 20 % • NP-40 1 % • pH 7,5 <p><u>Tampon de lyse complet</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 ml tampon lyse stock • 10 µl DTT 1M • 80 µl PIC
Lysat	Dilué dans du tampon de lyse à une concentration de 10 µg/20 µl	
Anticorps primaire	Anti-Nrf2 (H-300) sc-13032 dilué 500x dans PBS 50 + BSA 1 %	Anti-p65 (C-20) sc-372 dilué 1000x dans PBS 50 + Gloria 1 %
Anticorps secondaire	Anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase dilué 1000x dans PBS 50 + Gloria 1 %	Anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase dilué 1000x dans PBS 50 + Gloria 1 %
Solution de rinçage	<ul style="list-style-type: none"> • PBS 50 (1 l): <ul style="list-style-type: none"> ➢ 3 g NaCl (Merck, Allemagne) ➢ 20 ml tampon phosphate 0,5 M pH 7,4 ➢ H₂O • PBS 50 + Tween 0,1 % (Sigma-Aldrich) 	

Tableau II. 12: Composition des différentes solutions utilisées pour le dosage de l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription à l'ADN.

Plaque 24 puits (Costar Corning, USA)	
Agent de transfection	Lipofectamine (Invitrogen)
Milieu de transfection	OptiMeM sans sérum (Gibco, UK)
PBS stérile (Lonza, SWZ)	
Milieu CO ₂ -indépendant complet	
TNF- α (Tumour Necrosis Factor ; R&D 210-TA)	
SIN-1 (3-morpholinosydnonimine, Invitrogen Molecular Probes, USA)	
Kit de révélation: Dual luciferase assay (Promega, USA)	Passive Lysis Buffer 5x
	Luciferase Assay Reagent II (LARII)
	Solution Stop and Glo 50x
PBS non stérile	
Cuvette Lumax (Stardest, GER)	
Luminomètre (FB12 Luminometer, Berthold Detection Systems, USA)	

Tableau II. 13 : Matériel requis pour la transfection des cellules.

	Nom du plasmide	Origine
Nrf2	ARE promoter-luciferase reporter construct (NQO1 wild-type)	Leonard et al. 2006
NFκB	pNF- κ B-Luc	Stratagene, USA
Plasmide de normalisation	Plasmide pRL-SV40	Promega, USA

Tableau II. 14: Les plasmides rapporteurs utilisés afin d'étudier l'activité des facteurs de transcription d'intérêt.

Tri Reagent Solution (Ambion/Applied Biosystems)
Chloroforme RNase free Sigma-Aldrich, USA)
Isopropanol 100 % RNase free (Merck, GER)
Ethanol 75 % RNase free (Merck, GER)
Eau RNase free
Microtubes RNase free
Tips RNase free
PBS RNase free
SDS 1 % (MP Biomedicals, FR)

Tableau II. 15 : Matériel utilisé lors de l'extraction d'ARN total.

Kit Roche	Primer oligo(dT)
	dNTP mix
	Buffer RT 5x
	Kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit
	Protector Rnase Inhibitor
	Reverse Transcriptase
	Eau RNase-free

Tableau II. 16 : Matériel requis pour la Reverse Transcription.

SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Holland)
Plaque 96 puits (96-well optical reaction plate; Applied Biosystems, Holland)
Film plastique (Optical Adhesive Covers; Applied Biosystems, Holland)
Logiciel 7000 SDS (Sequence Detection System, Applied Biosystem, Holland)
Eau RNase free

Tableau II. 17 : Matériel utilisé lors de la RT-PCR en temps réel.

	Gène cible	Référence	Séquence
Nrf2	HO-1	HO1-16F	GCAGTCAGGCAGAGGGTGATA
		HO1-87R	CAACTCCTCAAAGAGCTGGATGTT
	NQO1	NQO1-96F	AATTCAGAGTGGCATTCTGCATTT
		NQO1-175R	CTGGAGTGTGCCCAATGCTATA
NFκB	IL-8	IL-8-114F	CTGGCCGTGGCTCTCTTG
		IL-8-238R	GGGTGGAAAGGTTTGGAGTATG
	MCP-1	MCP-1-132F	CATTGTGGCCAAGGAGATCTG
		MCP-1-237R	AGTGAGTGTTCAAGTCTTCGGAGTT
Housekeeping gene	23 kDHBP	23 kDHBP-F	GCCTACAAGAAAGTTTGCCTATCTG
		23 kDHBP-R	TGAGCTGTTTCTTCTTCCGGTAGT

Tableau II. 18: Les différentes amorces utilisées lors de la real-time PCR.

Kit ELISA Quantikine IL-8 (R&D Systems)	Plaque 96 puits coatée avec un anticorps de souris dirigé contre la protéine IL-8
	Anticorps polyclonal anti-IL-8 conjugué à la peroxydase horseradish
	Standard IL-8 (IL-8 humaine recombinante)
	Assay Diluent RD1-85 (tampon de dilution pour les échantillons)
	Calibrator Diluent RD5P Concentrate (5x)
	Calibrator Diluent RD5P (1x) (tampon pour la dilution du Standard IL-8)
	Wash Buffer
	Réactif de coloration A (peroxyde d'hydrogène)
	Réactif de coloration B (tétraméthylbenzidine)
	Solution STOP

Tableau II. 19 : Matériel requis pour le dosage de l'IL-8 par ELISA.

Na ₂ CO ₃ 2 % (Merck, GER)
CuSO ₄ 1 % (Merck, GER)
Solution de tartrate de sodium et potassium
NaOH 1N (Merck, GER)
BSA (2 mg/ml)
Réactif de Folin (Merck, GER)
Tubes (Kartels, ITA)

Tableau II. 20 : Matériel requis pour le dosage des protéines par la méthode de Folin

présence du TNF- α augmente fortement l'expression d'IL-8. Cet effet du TNF- α est augmenté uniquement en condition d'hypoxie intermittente.

4.7. Conclusion intermédiaire

Suite à l'ensemble des résultats, nous pouvons déjà conclure que le suivi de l'expression protéique par western blot et par immunofluorescence n'a pas mis en évidence d'effet de l'hypoxie intermittente ni de l'hypoxie chronique sur l'abondance et la translocation nucléaire de NF- κ B en condition basale (tableau III.2). Par contre, un effet spécifique de l'hypoxie intermittente a été observé sur l'activité de liaison à l'ADN de la protéine mais aucun effet n'a été mis en évidence sur l'activité transcriptionnelle, ceci est peut être dû au système artificiel utilisé. L'étude de l'expression des gènes cibles de NF- κ B, IL-8 et MCP-1 a montré un effet stimulateur de l'hypoxie intermittente et de l'hypoxie chronique. Plus particulièrement, l'expression du gène MCP-1 est plus élevée en hypoxie intermittente par rapport à l'hypoxie chronique.

Lorsque les cellules sont stimulées, l'hypoxie intermittente augmenterait l'effet du TNF- α de manière générale. Toutefois, si l'hypoxie intermittente augmente l'effet du TNF- α sur l'abondance nucléaire et la translocation nucléaire de NF- κ B dans les cellules marquées en immunofluorescence, aucun effet n'est observé sur l'abondance nucléaire étudiée par western blot. Par contre, l'augmentation de l'effet du TNF- α sur l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B en hypoxie intermittente mais aussi en hypoxie chronique est en corrélation avec les résultats obtenus par marquage en immunofluorescence. Aucune augmentation de l'effet du TNF- α n'est observée sur l'activité transcriptionnelle en hypoxie intermittente et en hypoxie chronique. L'artificialité du système pourrait à nouveau expliquer cette incohérence. L'étude de l'expression des gènes IL-8 et MCP-1 a montré une influence de l'hypoxie intermittente sur l'effet du TNF- α . L'augmentation de l'effet du TNF- α sur l'expression du gène IL-8 est spécifique de l'hypoxie intermittente. L'étude de l'expression protéique d'IL-8 montre une augmentation de l'effet du TNF- α qui est spécifique de l'hypoxie intermittente.

IV. Discussion

Les fluctuations du flux sanguin au sein de la tumeur sont à l'origine des phases successives d'hypoxie et de réoxygénation de l'hypoxie intermittente. Celle-ci affecte les cellules cancéreuses en induisant des changements dans la réponse cellulaire leur permettant de s'adapter à la diminution transitoire de la pression partielle en oxygène. Ainsi, l'expression de nombreux gènes régulés par des facteurs de transcription importants est modifiée en condition d'hypoxie intermittente. Nous savons que l'hypoxie intermittente influence l'activité du facteur de transcription HIF-1, favorisant la survie et la prolifération des cellules dans un environnement hypoxique. Nous avons voulu étudier l'influence de l'hypoxie intermittente sur l'activité de deux autres facteurs de transcription : Nrf2 et NF- κ B. Le premier est activé par un faible stress oxydatif tandis que le deuxième est induit par un stress oxydatif modéré (Gloire et al., 2006). L'hypoxie intermittente induisant la production de ROS, ces facteurs de transcription pourraient être impliqués dans la réponse adaptative des cellules tumorales à l'hypoxie intermittente et jouer un rôle dans la protection et la défense des cellules contre les ROS. Nous savons par la littérature que ces ROS sont produits majoritairement lors des phases de réoxygénation qui suivent les phases d'hypoxie (Li et Jackson, 2002 ; Toffoli et al. 2009).

1. Régulation du facteur de transcription HIF-1 par l'hypoxie intermittente

Notre étude a mis en évidence une augmentation de l'abondance nucléaire de la sous-unité HIF-1 α en hypoxie chronique et en hypoxie intermittente. Cette augmentation est plus prononcée en hypoxie chronique. En effet, la sous-unité HIF-1 α est dégradée lors de chaque nouvelle phase de réoxygénation de l'hypoxie intermittente.

Les résultats de cette expérience indiquent que les cellules MDA-MD-231 perçoivent l'hypoxie et y répondent par l'activation du facteur HIF-1. Ils permettent également de conclure que l'hypoxie intermittente induit la stabilisation et la translocation nucléaire de HIF-1 α , et par conséquent, la formation du facteur de transcription HIF-1. En effet, selon la littérature, une diminution de la pression partielle en oxygène en condition d'hypoxie intermittente favorise une diminution de l'activité des prolyl hydroxylases responsables de l'initiation du processus de dégradation de HIF-1 α par le complexe ubiquitine ligase E3. La sous-unité stabilisée transloque alors dans le noyau où elle dimérise avec la sous-unité ARNT pour former le facteur de transcription HIF-1 (Zagorska et al., 2004).

2. Régulation du facteur de transcription Nrf2 par l'hypoxie intermittente

Les résultats obtenus par western blot et marquage en immunofluorescence ont montré une augmentation de l'abondance et de la translocation nucléaire de Nrf2 en conditions d'hypoxie chronique ou d'hypoxie intermittente. Toutefois, la translocation nucléaire de Nrf2 n'est pas complète. Lorsque les cellules sont stimulées, l'hypoxie intermittente ne modifie pas l'effet du t-BHQ sur l'abondance et la localisation nucléaire de la protéine. Ces résultats ont été confirmés par l'étude de l'activité de liaison à l'ADN, montrant une augmentation de l'activité de liaison à l'ADN en hypoxie intermittente seule, alors qu'aucun effet n'est observé en présence du t-BHQ.

L'activité transcriptionnelle de Nrf2 n'est pas influencée par l'hypoxie intermittente ni par l'hypoxie chronique en condition basale. Dans les cellules stimulées, on observe une tendance de l'hypoxie intermittente à réduire l'effet du t-BHQ sur l'activité transcriptionnelle. Cette

diminution est plus prononcée pour les cellules incubées en HI que pour les cellules incubées en HC. Le suivi de l'expression des gènes HO-1 et NQO1 a mis en évidence une augmentation de l'expression de ces deux gènes en condition d'hypoxie intermittente. Cette augmentation est plus prononcée en condition d'hypoxie chronique pour le gène HO-1. Les résultats obtenus pour l'étude de l'activité transcriptionnelle de Nrf2 ne sont pas en corrélation avec ces résultats puisqu'ils ne montrent aucun effet de l'hypoxie intermittente sur l'activité transcriptionnelle.

Lorsque les cellules sont stimulées, l'expression des deux gènes est diminuée en condition d'hypoxie intermittente et plus particulièrement pour le gène HO-1. Cette diminution de l'expression des deux gènes est également observée en condition d'hypoxie chronique. L'analyse de l'activité transcriptionnelle a également révélé une diminution de l'effet du t-BHQ en hypoxie intermittente.

L'ensemble des résultats indiquent que l'hypoxie intermittente influence la régulation de Nrf2 en condition basale en augmentant son abondance nucléaire et son activité de liaison. Bien que l'activité transcriptionnelle ne soit pas affectée, ces effets permettent une augmentation de l'expression des gènes régulés par Nrf2. Par contre, dans les cellules stimulées, l'abondance nucléaire et l'activité de liaison à l'ADN de Nrf2 ne sont pas modifiées. Cependant, l'activité transcriptionnelle est diminuée, ce qui entraîne une sous-expression des gènes cibles de Nrf2.

Comme dit précédemment, il est suggéré dans la littérature que l'hypoxie intermittente serait impliquée dans la production de ROS (Li et Jackson, 2002 ; Poyton et al., 2009). W. Xu et al. (2004) ont montré expérimentalement que l'hypoxie intermittente augmente la production de ROS dans le cortex cérébral murin et les cellules neuronales corticales chez des souris adultes C57BL/6J et des souris transgéniques-SOD1. Les souris ont été exposées à l'hypoxie intermittente dans une chambre selon le modèle expérimental suivant : alternance d'une pression partielle en oxygène de 21% et 5,7% toutes les 90 sec, sur une période de 30 jours. Par ailleurs, Sébastien Toffoli et al. (2009) ont observé à l'aide de la sonde H₂DCF-DA une production de ROS plus particulièrement pendant la phase de réoxygénation suivant la première phase d'hypoxie.

L'accumulation de ROS perturbe l'équilibre rédox, un stress oxydatif est induit dans la cellule. Un stress oxydatif faible est à l'origine de la dissociation de Keap1 et Nrf2 et de la translocation de Nrf2 dans le noyau (Li et Kong, 2009). En effet, l'activation de Nrf2 par un stress oxydatif a été mise en évidence via l'exposition de macrophages RAW 264.7 à l'acide hypochloreux (HOCl). Une augmentation, dépendante de la concentration, de l'abondance nucléaire de Nrf2 a été observée ainsi qu'une augmentation de l'activité de liaison à l'ADN (Pi et al., 2008). Augustin Baulig et al. (2003) ont montré qu'un stress oxydatif induit par l'exposition aux particules de gaz d'échappement des cellules 16-HBE (cellules épithéliales bronchiales humaines) entraînent la translocation de Nrf2 du cytoplasme vers le noyau.

L'augmentation de l'abondance et de la translocation nucléaire de Nrf2 en hypoxie intermittente et en condition basale, observée lors de nos expériences, est en accord avec ce que nous apprend la littérature. Toutefois, la translocation nucléaire de Nrf2 n'est pas complète. Récemment, un nouveau modèle de la réponse antioxydante via le complexe Nrf2/Keap1 a été proposé et pourrait expliquer la translocation incomplète de Nrf2 (figure IV.1). Selon ce modèle, deux pools de protéines Nrf2 seraient localisés dans le cytoplasme en condition basale : un pool de protéines liées à Keap1 et un pool de protéines libres. Un équilibre s'établirait entre la synthèse constitutive de nouvelles protéines Nrf2 et la dégradation constante de protéines Nrf2. Par conséquent, un petit pool de protéines libres

serait suffisant pour l'activité basale de Nrf2 dans la réponse antioxydante. Ces données pourraient expliquer le fait que Nrf2 est localisé à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme en condition de normoxie. Ainsi, l'expression basale des gènes cibles de Nrf2 serait maintenue en conditions homéostatiques. De cette manière, les cellules possèdent un système de défense de protection et de détoxification constitutif contre les ROS. En condition de stress oxydatif, Nrf2 n'est plus ubiquitinylé mais il forme toujours un complexe avec Keap1. De nouvelles protéines Nrf2 sont synthétisées alors que la protéine n'est plus dégradée, ce qui entraîne la saturation des complexes Keap1/Nrf2. Suite à ces événements, le pool de protéines libres dans le cytoplasme augmente et est transloqué dans le noyau. L'augmentation de l'abondance nucléaire de Nrf2 en hypoxie intermittente sans translocation complète de Nrf2 pourrait être expliquée par ce nouveau modèle. Les protéines Nrf2 encore présentes dans le cytoplasme en hypoxie intermittente seraient alors les protéines Nrf2 liées aux protéines Keap1 via le motif DLG. Dans ce nouveau modèle, les fluctuations du statut rédox de la cellule sont transmises au noyau par le pool de protéines Nrf2 libres. De plus, l'intensité de la réponse antioxydante serait déterminée par la taille du pool de protéines Nrf2 libres. Keap1 et Nrf2 deviennent tous les deux des senseurs du stress oxydatif (Tong et al, 2006 ; Li et Kong, 2009).

L'effet de l'hypoxie intermittente et de l'hypoxie chronique sur Nrf2 est également étudié dans les cellules endothéliales EAhy926 en condition basale ou en présence de t-BHQ (Déborah Desmet, thèse, données non publiées). L'hypoxie intermittente et l'hypoxie chronique seules induisent une augmentation de l'abondance nucléaire du facteur. En présence du t-BHQ, ni l'hypoxie intermittente ni l'hypoxie chronique ne modifient l'abondance nucléaire. Les conditions expérimentales d'incubation sont les mêmes que les nôtres. Ces résultats sont en concordance avec ceux observés dans les cellules MDA-MB-231. Egalement, dans le cadre de l'étude des dommages provoqués par l'ischémie-reperfusion, une augmentation de l'abondance nucléaire de Nrf2 a été mise en évidence dans les cellules épithéliales rénales humaines HK-2 incubées en hypoxie pendant une période de 16 h suivie par une période de réoxygénation de 2 h (Leonard et al., 2006). Les conditions expérimentales d'incubation sont différentes de celles utilisées au laboratoire. Les études réalisées par Yun-Jeong Kim et al. (2007) concordent également avec nos résultats puisqu'elles ont mis en évidence une augmentation de la localisation nucléaire de Nrf2 dans des cellules cancéreuses de poumon A549 exposées aux conditions d'hypoxie (4h)/réoxygénation (2h). Ces résultats indiquent que la réoxygénation après une période d'hypoxie pourrait activer Nrf2 au moins dans certains types cellulaires.

Dans le noyau, Nrf2 interagit avec des petites protéines Maf qui favorisent la liaison de Nrf2 à la séquence ARE (Li et Kong, 2009). Nos résultats ont montré cette augmentation de l'activité de liaison à l'ADN en hypoxie intermittente et en condition basale dans les cellules MDA-MB-231. Ces résultats indiquent que, dans les cellules MDA-MB-231 incubées en hypoxie intermittente, Nrf2 est transloqué du cytoplasme vers le noyau et est capable de reconnaître et de se lier à sa séquence consensus ARE dans le promoteur de ses gènes cibles. Dans les cellules endothéliales EAhy926, l'hypoxie intermittente ainsi que l'hypoxie chronique n'augmentent pas l'activité de liaison à l'ADN de Nrf2 par rapport à la normoxie. L'activité de liaison est diminuée en hypoxie chronique et en hypoxie intermittente lorsque NF- κ B est induit par le t-BHQ (Déborah Desmet).

Une augmentation de l'activité de liaison à l'ADN a également été observée dans les cellules cancéreuses de poumon A549 pendant la réoxygénation après une période d'incubation de 4 h en hypoxie, et ceci, déjà après une période de 30 min en condition de réoxygénation. Les conditions expérimentales d'incubation sont toutefois différentes des nôtres (Kim et al., 2007).

Afin de vérifier l'augmentation observée par TransAM, l'activité transcriptionnelle de Nrf2 a été étudiée par système rapporteur. Aucun effet de l'hypoxie intermittente sur l'activité transcriptionnelle de Nrf2 n'a été mis en évidence en hypoxie intermittente et en condition basale. D'après les résultats, l'augmentation de l'abondance nucléaire et de l'activité de liaison à l'ADN sont suffisantes pour augmenter l'expression des gènes cibles. L'activité transcriptionnelle n'est pas modifiée peut être parce que Nrf2 doit subir des modifications post-traductionnelles (comme par exemple la phosphorylation), afin de devenir complètement actif transcriptionnellement, qui ne seraient pas induites dans nos conditions expérimentales. L'activité transactivatrice de Nrf2 a également été analysée dans les cellules endothéliales EAhy926 et est diminuée en conditions d'hypoxie chronique et intermittente par rapport à la normoxie, en présence du SIN-1. Cette diminution est corrélée à la diminution de l'activité de liaison de Nrf2 en hypoxie chronique et intermittente, lorsque les cellules sont stimulées. L'hypoxie intermittente seule diminue l'activité de liaison à l'ADN (Déborah Desmet).

Nous savons par la littérature que la liaison de Nrf2 à sa séquence ARE et son activation transcriptionnelle sont nécessaires pour l'expression des gènes cibles de Nrf2 (Niture et al., 2010). Nous avons pu montrer que l'hypoxie intermittente augmente l'expression des gènes HO-1 et NQO1. Ces résultats sont en corrélation avec ceux mettant en évidence une augmentation de l'activité de liaison à l'ADN. Par contre, alors que l'expression de ces gènes est augmentée, l'activité transcriptionnelle de Nrf2 n'est pas modifiée lors de son étude par système rapporteur qui ne nous permet peut être pas de détecter une petite modification d'activité. Dans les cellules endothéliales EAhy926, l'expression du gène HO-1 a également été étudiée et une diminution de l'expression en ARNm est observée en hypoxie intermittente et en hypoxie chronique en présence ou en absence de t-BHQ (Déborah Desmet). Dans ces cellules, il a été montré que la protéine Bach1 (un inhibiteur de Nrf2) serait impliqué dans la diminution de l'activité de liaison à l'ADN, de l'activité transcriptionnelle de Nrf2 et de l'expression du gène HO-1 en hypoxie intermittente, en présence de t-BHQ. L'abondance nucléaire de Bach1 augmente en hypoxie intermittente dans les cellules stimulées et réprimerait l'activité de Nrf2.

3. Régulation du facteur de transcription NF- κ B par l'hypoxie intermittente

L'étude de l'abondance et de la localisation nucléaire de NF- κ B n'a pas mis en évidence d'effet ni de l'hypoxie intermittente, ni de l'hypoxie chronique en condition basale.

Lorsque les cellules sont stimulées, seule l'hypoxie chronique a un effet sur l'étude de l'abondance nucléaire de NF- κ B en western blot. Un effet de l'hypoxie chronique et de l'hypoxie intermittente a été mis en évidence sur l'abondance et la translocation nucléaire de NF- κ B lorsqu'il est activé par le TNF- α par marquage en immunofluorescence.

L'étude de l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B a montré un effet spécifique de l'hypoxie intermittente en condition basale alors qu'aucun effet de l'hypoxie intermittente n'a été mis en évidence sur l'abondance et la translocation nucléaire de NF- κ B. En condition stimulée, l'hypoxie intermittente, mais également l'hypoxie chronique, augmentent l'effet du TNF- α sur l'activité de liaison à l'ADN. Ces résultats sont corrélés à ceux concernant l'abondance nucléaire obtenus par western blot et marquage en immunofluorescence dans les cellules incubées en présence du TNF- α et en hypoxie chronique ou en hypoxie intermittente. L'analyse de l'activité transactivatrice de NF- κ B n'a pas révélé d'effet de l'hypoxie intermittente en condition basale. De même, l'hypoxie intermittente ne modifie pas l'effet du TNF- α sur l'activité transcriptionnelle. En conclusion, on observe un effet de l'hypoxie

intermittente sur l'activité de liaison à l'ADN en condition basale. En condition stimulée, l'abondance nucléaire et l'activité de liaison à l'ADN sont augmentées.

L'expression des gènes IL-8 et MCP-1 est augmentée en hypoxie chronique et en hypoxie intermittente, en condition basale. Cette augmentation est spécifique de l'hypoxie intermittente en ce qui concerne l'expression du gène MCP-1. Leur expression est également augmentée en présence de TNF- α et en hypoxie intermittente. L'augmentation de l'expression du gène IL-8 est spécifique de l'hypoxie intermittente puisque l'hypoxie chronique n'a pas d'effet.

Lorsque les cellules sont stimulées, l'hypoxie intermittente augmente spécifiquement l'effet du TNF- α sur la sécrétion d'IL-8. L'expression du gène IL-8 est également augmentée dans les mêmes conditions.

En conclusion, en condition basale, l'hypoxie intermittente influencerait l'activité de liaison de NF- κ B à l'ADN et l'expression des gènes IL-8 et MCP-1. Lorsque les cellules sont stimulées, l'hypoxie intermittente semble accentuer l'effet du TNF- α en général, renforçant ainsi l'environnement pro-inflammatoire.

Il est suggéré dans la littérature que NF- κ B est également un facteur activé lors de l'accumulation de ROS dans la cellule, comme le facteur Nrf2. Toutefois, il est induit lors d'un stress oxydatif modéré (Gloire et al., 2006). Josep Lluís et al. (2007) ont montré que les ROS produits par la mitochondrie lors de l'hypoxie activent NF- κ B dans les cellules HepG2. Un excès de ROS peut être généré lors de l'hypoxie intermittente comme expliqué précédemment (Toffoli et al., 2009). Il a été montré que l'hypoxie/réoxygénation mène à la phosphorylation de la tyrosine de I κ B α par la protéine c-Src et à l'activation transcriptionnelle de NF- κ B de manière indépendante de la voie IKK dans les cellules HeLa (Fan et al., 2003). La phosphorylation de I κ B α permettrait la libération du facteur NF- κ B et donc sa translocation du cytoplasme vers le noyau (Gloire et al., 2006). Dans les cellules MDA-MB-231, l'HI seule n'influence pas la translocation nucléaire de NF- κ B. Cependant, le modèle d'hypoxie/réoxygénation n'est pas le même. L'abondance et la localisation nucléaire de NF- κ B sont augmentées en hypoxie intermittente en présence de TNF- α . Il est par ailleurs observé que la translocation nucléaire du facteur n'est pas complète. NF- κ B est activé environ après 20 min de stimulation (Hoffman et al., 2002), or, l'incubation dans les différentes conditions s'étalait sur une période de 6 h. Pendant cette longue période d'incubation, de nouvelles protéines I κ B peuvent être donc synthétisées et transporter le facteur de transcription du noyau vers le cytoplasme. L'abondance et la localisation nucléaire de NF- κ B ont également été étudiées dans les cellules endothéliales EAhy926 incubées en normoxie, en hypoxie chronique ou en hypoxie intermittente pendant 6h. Sébastien Toffoli et al. (2009) n'ont pas observé d'effet de l'hypoxie intermittente comme nous avons pu l'observer dans les mêmes conditions dans les cellules tumorales MDA-MB-231.

Dans le noyau, NF- κ B se lie à sa séquence consensus κ B sur le promoteur de ses gènes cibles suite à un stimulus tel que l'initiation d'un stress oxydatif modéré (Hayden et Ghosh, 2008). Les résultats ont montré une augmentation de l'activité de liaison en hypoxie intermittente à la fois en condition basale et dans les cellules stimulées. Ceci nous indique que NF- κ B est capable de se lier à sa séquence consensus κ B dans le promoteur de ses gènes cibles dans ces conditions, ce qui suggère que dans ces conditions, NF- κ B est libéré et transloqué du cytoplasme vers le noyau suite à la dégradation des protéines inhibitrices I κ B α .

Harly Greenberg et al. (2006) ont montré *in vivo* que l'activité de liaison à l'ADN augmente dans les cellules de muscle lisse vasculaire et les cellules endothéliales composant l'aorte de souris exposées à l'hypoxie intermittente pendant 8 jours, indiquant que NF- κ B est sensible à

une production transitoire de ROS. L'activité de liaison à l'ADN du facteur a également été étudiée dans les cellules HeLa exposées de 2 à 16 cycles d'hypoxie intermittente (5 min d'hypoxie suivie de 10 min de réoxygénation). L'hypoxie intermittente augmente l'activité de liaison à l'ADN de manière dose-dépendante avec un maximum après 16 cycles. Un effet modéré de l'hypoxie chronique a été observé.

NF- κ B induit l'expression de ses gènes lorsqu'il est activé transcriptionnellement par modifications post-traductionnelles et grâce à son interaction avec des coactivateurs (Hayden et Ghosh, 2008). Nous n'avons pas mis en évidence d'effet de l'hypoxie intermittente sur l'activité transcriptionnelle en condition basale ou en présence de TNF- α dans les cellules MDA-MB-231. Cependant, le fait qu'un facteur soit capable de se lier à sa séquence consensus n'implique pas forcément qu'il soit actif transcriptionnellement. Il est possible que d'autres coactivateurs ou d'autres événements (modifications post-traductionnelles) interviennent dans la régulation de l'activité transactivatrice de NF- κ B dans les cellules tumorales MDA-MB-231. On observe malgré tout une augmentation de la transcription des gènes cibles de NF- κ B : nous observons que IL-8 et MCP-1 sont induit en hypoxie intermittente, en condition basale et dans les cellules stimulées. Ces gènes codent pour des chémokines très importantes dans la réponse inflammatoire initiée par NF- κ B suite aux dommages oxydatifs provoqués par l'accumulation de ROS. Les chémokines sont des médiateurs inflammatoires recrutant des leucocytes dont les monocytes et les lymphocytes pour la chémokine MCP-1, et des neutrophiles pour la chémokine IL-8. Ces cellules phagocytaires et inflammatoires seront recrutées vers les tissus dans lesquels NF- κ B a été activé par des dommages provoqués par un stress oxydatif.

Ainsi, soit l'augmentation de l'abondance nucléaire et de l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B est suffisante pour induire une sur-expression de ses gènes cibles, soit ces gènes sont régulés par d'autres facteurs de transcription.

Par contre, Naoto Burioka et al. (2009) ont quant à eux observé une augmentation de l'activité transactivatrice de NF- κ B dès 8 cycles d'hypoxie intermittente dans les cellules cancéreuses de poumon A549, alors qu'ils n'ont pas observé d'effet de l'hypoxie chronique. La cinétique d'incubation est différente puisque les cellules sont exposées à l'hypoxie intermittente pour 4, 6, 8 ou 10 cycles de 5 min d'hypoxie suivie de 10 min de réoxygénation. L'hypoxie intermittente augmente également l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription, plus particulièrement dans les cellules HeLa exposées à 8 ou 16 cycles de 5 min d'hypoxie suivie de 10 min de réoxygénation (Ryan et al., 2005).

De plus, l'étude de l'expression de la chémokine IL-8 par ELISA a montré que la sécrétion de cette molécule était augmentée en hypoxie intermittente, en présence de TNF- α . Par contre, aucun effet n'est observé en hypoxie intermittente en condition basale probablement parce qu'il n'y a pas de sécrétion basale d'IL-8 par les cellules MDA-MB-231. Ces résultats montrent que les changements dans l'expression de l'ARNm codant pour l'IL-8 ne sont pas toujours corrélés à une augmentation de l'expression de la protéine.

Dans les cellules endothéliales microvasculaires dermiques humaines exposées à l'hypoxie intermittente, la sécrétion d'IL-8 n'est pas augmentée. L'incubation des cellules avec le TNF- α , par contre, montre une augmentation de la sécrétion en IL-8 (Natarajan et Fisher, 2002).

Les résultats tentent à montrer que l'activité du facteur Nrf2 est diminuée lorsque les cellules sont stimulées alors que l'activité du facteur NF- κ B est augmentée dans les cellules MDA-MB-231. En effet, l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B est augmentée en condition d'hypoxie intermittente et en condition d'hypoxie chronique, tandis que l'hypoxie intermittente ne modifie pas l'effet du t-BHQ sur l'activité de liaison de Nrf2. De plus,

l'expression des gènes HO-1 et NQO1 est diminuée en présence du t-BHQ et en hypoxie intermittente ou en hypoxie chronique. Par contre, l'expression des gènes régulés par NF- κ B est augmentée en hypoxie intermittente et en présence du TNF- α , plus particulièrement pour le gène IL-8 dont l'expression de la protéine est également augmentée dans les mêmes conditions. Il semblerait que le stress oxydatif induit par l'hypoxie intermittente dans les cellules stimulées favorise une réponse inflammatoire plutôt qu'une réponse antioxydante dans les cellules tumorales MDA-MB-231. Ces résultats suggèrent que le taux de ROS produits est tel qu'il induit des dommages trop importants dans la cellule pour qu'elle puisse se défendre uniquement par la voie antioxydante.

V. Conclusions et perspectives

L'hypoxie est une caractéristique du microenvironnement tumoral affectant la survie et la prolifération des cellules tumorales. Dans les tumeurs, l'hypoxie peut être chronique suite à l'augmentation de la distance de diffusion de l'oxygène mais elle peut être également transitoire de part la formation de nouveaux vaisseaux sanguins structurellement et fonctionnellement anormaux. Les effets de l'hypoxie chronique sur les cellules tumorales sont largement étudiés. Elle protège notamment les cellules tumorales de l'apoptose induite par les traitements chimiothérapeutiques et radiothérapeutiques. L'hypoxie intermittente protège également les cellules tumorales contre les traitements anticancéreux (Toffoli et al., 2008). De plus, elle favorise la croissance cellulaire tumorale, le processus angiogénique, la dissémination des cellules tumorales et la formation de métastases (Höckel et Vaupel, 2001). Par contre, les mécanismes de régulation impliqués dans les réponses cellulaires de la cellule tumorale à l'hypoxie intermittente ne sont pas encore compris. L'hypoxie intermittente peut induire une réponse adaptative des cellules tumorales différente de l'hypoxie chronique. De plus, les mécanismes d'adaptation impliqués peuvent être différents selon que des cellules cancéreuses ou des cellules endothéliales soient exposées aux fluctuations de la pression partielle en oxygène (Toffoli et al., 2008). C'est pourquoi, nous avons choisi d'étudier dans ce mémoire l'influence de l'hypoxie intermittente sur l'activité de facteurs de transcription et leurs gènes cibles dans des cellules cancéreuses.

L'hypoxie intermittente modifie l'activité de différents facteurs de transcription dont le facteur HIF-1. Celui-ci régule l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines favorisant la survie et l'adaptation des cellules tumorales en absence d'oxygène (Harris, 2002). Les phases successives d'hypoxie et de réoxygénation de l'hypoxie intermittente semblent être impliquées dans la production de ROS (Li et Jackson, 2002 ; Poyton et al. 2009). Ces molécules réactives peuvent modifier l'expression de nombreux gènes via la régulation de facteurs de transcription dont Nrf2 et NF- κ B. Ces deux facteurs ont été étudiés plus précisément étant donné le rôle important qu'ils pourraient jouer dans l'adaptation des cellules à l'hypoxie intermittente. Nrf2 est activé par un faible stress oxydatif (Gloire et al., 2006) et régule l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la détoxification et la neutralisation des ROS (Niture et al., 2010). NF- κ B est activé par un stress oxydatif modéré (Gloire et al., 2006) et active l'expression de gènes pro-inflammatoires (Bonizzi et Karin, 2004). L'objectif de ce mémoire est donc d'évaluer l'influence des phases successives d'hypoxie/réoxygénation sur l'activité des facteurs Nrf2 et NF- κ B et l'expression de leurs gènes cibles.

Au cours du mémoire, l'activité de HIF-1 a tout d'abord été étudiée afin de s'assurer que les cellules répondent bien aux changements de pression partielle en oxygène par l'activation du facteur. En général, en ce qui concerne les trois facteurs de transcription étudiés (HIF-1, Nrf2 et NF- κ B), les cellules MDA-MB-231 sont incubées dans trois conditions différentes : en normoxie (N), en hypoxie chronique (HC) ou en hypoxie intermittente (HI). L'influence de la normoxie et de l'hypoxie chronique est également étudiée afin de déterminer l'effet spécifique de l'hypoxie intermittente sur les cellules MDA-MD-231. L'hypoxie intermittente se compose de 4 cycles d'1h d'hypoxie et de 30 min de réoxygénation. Ces conditions expérimentales d'incubation ont été déterminées au préalable dans notre laboratoire et ont été jugées suffisantes pour induire l'activité de facteurs de transcription dont HIF-1 (Toffoli et al., 2007). Un nombre plus faible de cycles ne semble pas être suffisant pour induire une activité, tandis qu'un nombre plus élevé de cycles n'est pas envisageable pratiquement lors de l'expérience. L'activité de Nrf2 et NF- κ B a été étudiée en condition basale et en condition

stimulée de manière à évaluer également l'effet de l'hypoxie intermittente sur l'activité déjà augmentée des deux facteurs dans les cellules MDA-MB-231.

L'étude de l'activité des deux facteurs Nrf2 et NF- κ B a été effectuée en suivant étape par étape le schéma d'activation théorique suite à un stimulus dans la cellule. Ainsi, l'expression protéique des deux facteurs a été suivie afin de mettre en évidence une translocation nucléaire. L'activité des deux facteurs a ensuite été étudiée afin de montrer une corrélation ou non de l'abondance nucléaire avec une translocation nucléaire et une activité transcriptionnelle. L'expression des gènes a également été suivie ainsi que l'expression d'une protéine régulée par le facteur NF- κ B afin de mettre en évidence une activation des facteurs et de comprendre les réponses adaptatives mises en place par les cellules MDA-MB-231 en hypoxie intermittente.

En condition basale, l'hypoxie intermittente a un effet positif sur l'activité de Nrf2 même si toutefois aucun effet n'a été montré pour l'activité transcriptionnelle de Nrf2 par système rapporteur. L'hypoxie chronique et l'hypoxie intermittente augmentent toutes les deux l'abondance et la translocation nucléaire de Nrf2 dans les cellules MDA-MB-231. Seul un effet spécifique de l'hypoxie intermittente est observé sur l'activité de liaison à l'ADN. En ce qui concerne l'expression du gène HO-1, l'hypoxie chronique a un effet plus prononcé que l'hypoxie intermittente, alors que les deux conditions d'incubation influencent de la même manière l'expression du gène NQO1. Ces résultats indiquent que l'activation de Nrf2 en hypoxie intermittente et en condition basale pourrait impliquer un mécanisme d'adaptation des cellules tumorales en réponse aux fluctuations de la pression partielle en oxygène. L'étude de l'expression des gènes HO-1 et NQO1 indiquerait que la cellule répondrait à l'hypoxie intermittente par l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la détoxification et la neutralisation de molécules oxydatives.

Lorsque les cellules sont stimulées, l'hypoxie intermittente diminue ou ne modifie pas l'effet du t-BHQ. En effet, ni l'hypoxie intermittente, ni même l'hypoxie chronique, ne modifient l'effet du t-BHQ sur l'abondance et la translocation nucléaire mais également sur l'activité de liaison à l'ADN de Nrf2. En revanche, l'activité transcriptionnelle de Nrf2 est fortement diminuée en hypoxie intermittente dans les cellules incubées en présence du SIN-1. Cet effet est également observé sur l'expression du gène HO-1 en présence du t-BHQ. Par contre, l'hypoxie intermittente diminue faiblement l'effet du t-BHQ sur l'expression du gène NQO1.

En ce qui concerne NF- κ B, en condition basale, l'hypoxie intermittente, ni l'hypoxie chronique, n'ont un effet sur l'abondance et la translocation nucléaire de NF- κ B. Une activité de liaison à l'ADN est observée spécifiquement en hypoxie intermittente, par contre, NF- κ B n'est pas actif transcriptionnellement dans les conditions d'hypoxie chronique ou d'hypoxie intermittente. L'expression des gènes IL-8 et MCP-1 est augmentée en hypoxie chronique et en hypoxie intermittente, avec une augmentation de l'expression de MCP-1 plus prononcée en hypoxie intermittente. Alors que le gène IL-8 est exprimé en hypoxie intermittente, la protéine IL-8 n'est pas sécrétée par les cellules MDA-MB-231 dans la même condition.

L'hypoxie intermittente induirait spécifiquement une activité de liaison à l'ADN de NF- κ B en condition basale ainsi qu'une augmentation de l'expression des gènes IL-8 et MCP-1. Les cellules MDA-MB-231 répondraient à l'hypoxie intermittente en induisant l'expression de gènes pro-inflammatoires via NF- κ B.

Lorsque les cellules sont stimulées, de manière générale, l'activité de NF- κ B est influencée par les phases successives d'hypoxie/réoxygénation. L'étude de l'abondance nucléaire par western blot montre une augmentation de cette dernière uniquement en hypoxie chronique. L'analyse de l'abondance et de la localisation nucléaire par marquage en immunofluorescence

met en évidence une influence de l'hypoxie chronique et de l'hypoxie intermittente sur le TNF- α . Ces deux conditions d'incubation augmentent également l'effet du TNF- α sur l'activité de liaison à l'ADN du facteur, alors que l'hypoxie intermittente n'a pas d'effet sur l'activité transcriptionnelle. L'hypoxie intermittente et l'hypoxie chronique augmentent l'expression des gènes IL-8 et MCP-1 dans les cellules incubées en présence du TNF- α . L'augmentation est plus prononcée en hypoxie intermittente pour le gène IL-8. Ceci est en corrélation avec l'augmentation de l'expression de la protéine plus importante en hypoxie intermittente.

Il semblerait que dans les cellules stimulées, l'hypoxie intermittente influence négativement l'activité de Nrf2, alors qu'elle favorise l'activité de NF- κ B dans les cellules MDA-MB-231. L'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B est ainsi augmentée en hypoxie intermittente. De plus, l'expression des deux gènes cibles est augmentée également en hypoxie intermittente ainsi que l'expression de la protéine IL-8. Quant à Nrf2, son activité de liaison n'est pas modifiée en hypoxie intermittente et son activité transcriptionnelle est fortement diminuée dans la même condition. Ses deux gènes cibles sont également sous-exprimés en hypoxie intermittente et ce, plus particulièrement pour le gène HO-1. On peut en déduire que les réponses adaptatives mises en place par les cellules tumorales favorisent l'induction de gènes pro-inflammatoires régulés par NF- κ B dans les cellules incubées en présence de TNF- α . Le stress induit par les phases successives d'hypoxie/réoxygénation serait trop important que pour activer uniquement la réponse antioxydante régulée par Nrf2.

A l'avenir, il sera intéressant d'étudier également l'expression de la protéine HO-1 par les cellules MDA-MB-231 en hypoxie intermittente et en condition basale ou en condition stimulée afin de confirmer l'activation de Nrf2 dans ces conditions. Une mesure de la production de ROS devrait également être envisagée afin de déterminer le taux de molécules oxydatives générées au cours des phases successives d'hypoxie/réoxygénation dans les cellules MDA-MB-231.

Il serait également pertinent d'analyser les mécanismes intervenant dans l'activation de Nrf2 et de NF- κ B dans les cellules MDA-MB-231 exposées à l'hypoxie intermittente. Ceci nous permettrait de déterminer les différents acteurs intervenant dans cette activation. Un autre choix d'étude serait la compréhension de réponses cellulaires à l'hypoxie intermittente, par exemple, en suivant l'influence de l'hypoxie intermittente sur la migration cellulaire ou sur la résistance des cellules cancéreuses aux traitements anticancéreux.

VI. Bibliographie

- Alam, J., D. Stewart, *et al.* (1999). "Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene." J Biol Chem **274**(37): 26071-26078.
- Baulig, A., M. Garlatti, *et al.* (2003). "Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **285**(3): L671-679.
- Berta, M., C. Brahimi-Horn, *et al.* (2004). "[Regulation of the Hypoxia-Inducible Factor-1alpha (HIF-1alpha): a breath of fresh air in hypoxia research]." J Soc Biol **198**(2): 113-120.
- Bonizzi, G. et M. Karin (2004). "The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity." Trends Immunol **25**(6): 280-288.
- Brown, J. M. (1990). "Tumor hypoxia, drug resistance, and metastases." J Natl Cancer Inst **82**(5): 338-339.
- Burioka, N., S. Koyanagi, *et al.* (2009). "Influence of intermittent hypoxia on the signal transduction pathways to inflammatory response and circadian clock regulation." Life Sci **85**(9-10): 372-378.
- Carmeliet, P. et R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." Nature **407**(6801): 249-257.
- Carrero, P., K. Okamoto, *et al.* (2000). "Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha." Mol Cell Biol **20**(1): 402-415.
- Castello, P. R., D. K. Woo, *et al.* (2008). "Oxygen-regulated isoforms of cytochrome c oxidase have differential effects on its nitric oxide production and on hypoxic signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(24): 8203-8208.
- Chan, J. Y. et M. Kwong (2000). "Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with targeted deletion of the Nrf2 basic-leucine zipper protein." Biochim Biophys Acta **1517**(1): 19-26.
- Chandel, N. S. et G. R. Budinger (2007). "The cellular basis for diverse responses to oxygen." Free Radic Biol Med **42**(2): 165-174.
- Copple, I. M., C. E. Goldring, *et al.* (2008). "The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity." Toxicology **246**(1): 24-33.
- Dewhirst, M. W., Y. Cao, *et al.* (2008). "Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response." Nat Rev Cancer **8**(6): 425-437.
- Dhakshinamoorthy, S. et A. K. Jaiswal (2001). "Functional characterization and role of INrf2 in antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene." Oncogene **20**(29): 3906-3917.
- Fan, C., Q. Li, *et al.* (2003). "Tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha activates NF kappa B through a redox-regulated and c-Src-dependent mechanism following hypoxia/reoxygenation." J Biol Chem **278**(3): 2072-2080.
- Gloire, G., S. Legrand-Poels, *et al.* (2006). "NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later." Biochem Pharmacol **72**(11): 1493-1505.
- Greenberg, H., X. Ye, *et al.* (2006). "Chronic intermittent hypoxia activates nuclear factor-kappaB in cardiovascular tissues in vivo." Biochem Biophys Res Commun **343**(2): 591-596.
- Guzy, R. D., B. Hoyos, *et al.* (2005). "Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing." Cell Metab **1**(6): 401-408.
- Guzy, R. D. et P. T. Schumacker (2006). "Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia." Exp Physiol **91**(5): 807-819.

- Hanahan, D. et R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Harris, A. L. (2002). "Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth." Nat Rev Cancer **2**(1): 38-47.
- Hashizume, H., P. Baluk, *et al.* (2000). "Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness." Am J Pathol **156**(4): 1363-1380.
- Hayden, M. S. et S. Ghosh (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." Cell **132**(3): 344-362.
- Hockel, M. et P. Vaupel (2001). "Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects." J Natl Cancer Inst **93**(4): 266-276.
- Hoffmann, A., A. Levchenko, *et al.* (2002). "The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation." Science **298**(5596): 1241-1245.
- Imbert, V., R. A. Rupec, *et al.* (1996). "Tyrosine phosphorylation of I kappa B-alpha activates NF-kappa B without proteolytic degradation of I kappa B-alpha." Cell **86**(5): 787-798.
- Kang, K. W., S. J. Lee, *et al.* (2002). "Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress." Mol Pharmacol **62**(5): 1001-1010.
- Kang, M. I., A. Kobayashi, *et al.* (2004). "Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(7): 2046-2051.
- Karin, M. (2006). "Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression." Nature **441**(7092): 431-436.
- Katoh, Y., K. Itoh, *et al.* (2001). "Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription." Genes Cells **6**(10): 857-868.
- Kim, Y. C., H. Masutani, *et al.* (2001). "Hemin-induced activation of the thioredoxin gene by Nrf2. A differential regulation of the antioxidant responsive element by a switch of its binding factors." J Biol Chem **276**(21): 18399-18406.
- Kim, Y. J., J. Y. Ahn, *et al.* (2007). "Human prx1 gene is a target of Nrf2 and is up-regulated by hypoxia/reoxygenation: implication to tumor biology." Cancer Res **67**(2): 546-554.
- Kobayashi, A., M. I. Kang, *et al.* (2004). "Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2." Mol Cell Biol **24**(16): 7130-7139.
- Kwast, K. E., P. V. Burke, *et al.* (1999). "Oxygen sensing in yeast: evidence for the involvement of the respiratory chain in regulating the transcription of a subset of hypoxic genes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5446-5451.
- Leonard, M. O., N. E. Kieran, *et al.* (2006). "Reoxygenation-specific activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 mediates cytoprotective gene expression in ischemia-reperfusion injury." FASEB J **20**(14): 2624-2626.
- Li, C. et R. M. Jackson (2002). "Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury." Am J Physiol Cell Physiol **282**(2): C227-241.
- Li, J., D. Johnson, *et al.* (2005). "Stabilization of Nrf2 by tBHQ confers protection against oxidative stress-induced cell death in human neural stem cells." Toxicol Sci **83**(2): 313-328.
- Li, W. et A. N. Kong (2009). "Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response." Mol Carcinog **48**(2): 91-104.
- Liao, D. et R. S. Johnson (2007). "Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer." Cancer Metastasis Rev **26**(2): 281-290.
- Lisy, K. et D. J. Peet (2008). "Turn me on: regulating HIF transcriptional activity." Cell Death Differ **15**(4): 642-649.

- Livolsi, A., V. Busuttil, *et al.* (2001). "Tyrosine phosphorylation-dependent activation of NF-kappa B. Requirement for p56 LCK and ZAP-70 protein tyrosine kinases." Eur J Biochem **268**(5): 1508-1515.
- Lluis, J. M., F. Buricchi, *et al.* (2007). "Dual role of mitochondrial reactive oxygen species in hypoxia signaling: activation of nuclear factor- κ B via c-SRC and oxidant-dependent cell death." Cancer Res **67**(15): 7368-7377.
- Martinive, P., F. Defresne, *et al.* (2006). "Preconditioning of the tumor vasculature and tumor cells by intermittent hypoxia: implications for anticancer therapies." Cancer Res **66**(24): 11736-11744.
- Michiels, C. (2004). "Physiological and pathological responses to hypoxia." Am J Pathol **164**(6): 1875-1882.
- Natarajan, R., B. J. Fisher, *et al.* (2002). "Reoxygenating microvascular endothelium exhibits temporal dissociation of NF-kappaB and AP-1 activation." Free Radic Biol Med **32**(10): 1033-1045.
- Naumov, G. N., L. A. Akslen, *et al.* (2006). "Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch." Cell Cycle **5**(16): 1779-1787.
- Niture, S. K., J. W. Kaspar, *et al.* (2010). "Nrf2 signaling and cell survival." Toxicol Appl Pharmacol **244**(1): 37-42.
- Pi, J., Q. Zhang, *et al.* (2008). "Activation of Nrf2-mediated oxidative stress response in macrophages by hypochlorous acid." Toxicol Appl Pharmacol **226**(3): 236-243.
- Poyton, R. O., K. A. Ball, *et al.* (2009). "Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling." Trends Endocrinol Metab **20**(7): 332-340.
- Ruas, J. L. et L. Poellinger (2005). "Hypoxia-dependent activation of HIF into a transcriptional regulator." Semin Cell Dev Biol **16**(4-5): 514-522.
- Ryan, S., C. T. Taylor, *et al.* (2005). "Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome." Circulation **112**(17): 2660-2667.
- Schmid, J. A. et A. Birbach (2008). "IkappaB kinase beta (IKKbeta/IKK2/IKBKB)--a key molecule in signaling to the transcription factor NF-kappaB." Cytokine Growth Factor Rev **19**(2): 157-165.
- Schottenfeld, D. et J. Beebe-Dimmer (2006). "Alleviating the burden of cancer: a perspective on advances, challenges, and future directions." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **15**(11): 2049-2055.
- Thimmulappa, R. K., K. H. Mai, *et al.* (2002). "Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray." Cancer Res **62**(18): 5196-5203.
- Toffoli, S., O. Feron, *et al.* (2007). "Intermittent hypoxia changes HIF-1alpha phosphorylation pattern in endothelial cells: unravelling of a new PKA-dependent regulation of HIF-1alpha." Biochim Biophys Acta **1773**(10): 1558-1571.
- Toffoli, S. et C. Michiels (2008). "Intermittent hypoxia is a key regulator of cancer cell and endothelial cell interplay in tumours." FEBS J **275**(12): 2991-3002.
- Toffoli, S., A. Roegiers, *et al.* (2009). "Intermittent hypoxia is an angiogenic inducer for endothelial cells: role of HIF-1." Angiogenesis **12**(1): 47-67.
- Tong, K. I., Y. Katoh, *et al.* (2006). "Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model." Mol Cell Biol **26**(8): 2887-2900.
- Valko, M., D. Leibfritz, *et al.* (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol **39**(1): 44-84.
- Valko, M., C. J. Rhodes, *et al.* (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." Chem Biol Interact **160**(1): 1-40.

- Vaupel, P. et L. Harrison (2004). "Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response." Oncologist **9 Suppl 5**: 4-9.
- Webb, C. P. et G. F. Vande Woude (2000). "Genes that regulate metastasis and angiogenesis." J Neurooncol **50**(1-2): 71-87.
- Wenger, R. H. (2002). "Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression." FASEB J **16**(10): 1151-1162.
- Xu, W., L. Chi, *et al.* (2004). "Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea." Neuroscience **126**(2): 313-323.
- Zagorska, A. et J. Dulak (2004). "HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing." Acta Biochim Pol **51**(3): 563-585.

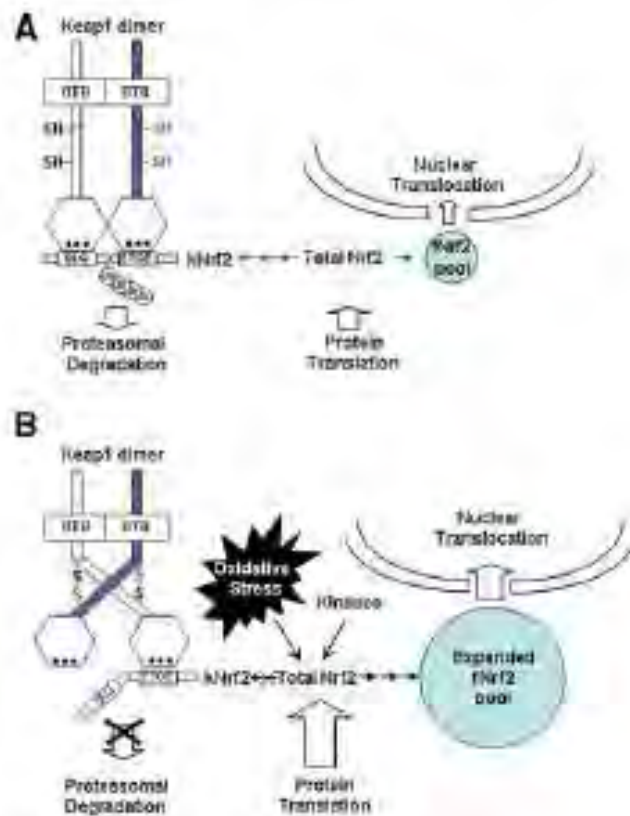


Figure IV. 1 : Modèle hypothétique de la réponse antioxydante via le complexe Nrf2-Keap1. Deux pools de protéines Nrf2 sont localisés dans le cytoplasme de la cellule : un pool de protéines Nrf2 liées à Keap1 (kNrf2) et un pool de protéines Nrf2 libres (fNrf2). En condition basale, il y aurait autant de nouvelles protéines Nrf2 synthétisées que de protéines Nrf2 dégradées. L'activité basale de Nrf2 serait assurée par un petit pool de protéines Nrf2 libres. En condition de stress oxydatif, Nrf2 n'est plus ubiquitinyllé ni dégradé et l'interaction entre le motif DLG et Keap1 est interrompue. Toutefois, Nrf2 et Keap1 forment toujours un complexe. Keap1 est saturé par la liaison de protéines Nrf2 non dégradées. Par conséquent, la synthèse de nouvelles protéines augmente et le pool de protéines Nrf2 libres augmente également. Il est alors transloqué dans le noyau où il induit la réponse antioxydante (Li et Jackson, 2009).